

Die subzelluläre Lokalisation und Wirkung auf α -Tubulin von Spastin und den Spastin-Mutanten K388R und S44L in eukaryotischen Zellsystemen.

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Konstantinos Moutzouris
geboren am 09.01.1976 in Wuppertal

Gutachter

1. Prof. Dr. med. T. Deufel, Jena

2. Prof. Dr. med. U. Claussen, Jena

3. Prof. Dr. med. G. Auburger, Frankfurt/ Main

Tag der öffentlichen Verteidigung: 04.03.08

Inhaltsverzeichnis

1	Die subzelluläre Lokalisation und Wirkung auf α -Tubulin von Spastin und den Spastin-Mutanten K388R und S44L in eukaryotischen Zellsystemen.....	6
1.1	Zusammenfassung:	6
2	Einführung	7
2.1	Hereditäre spastische Paraplegie(HSP)	7
2.1.1	Klinische Formen der HSP	7
2.1.1.1	Die reine Form der HSP	8
2.1.1.2	Die komplizierte Form der HSP	8
2.1.2	Pathologie der Erkrankung	9
2.1.3	Diagnosekriterien.....	9
2.1.4	Therapie der Erkrankung	10
2.1.5	Epidemiologie der Erkrankung.....	10
2.2	Molekulargenetische Grundlagen der HSP	10
2.2.1	X-chromosomaler Erbgang.....	12
2.2.2	Autosomal-rezessiver Erbgang.....	12
2.2.3	Autosomal-dominanter Erbgang	12
2.2.3.1	SPG4 assoziierte HSP.....	13
2.3	Merkmale des Spastin-Proteins	13
2.3.1	Die AAA-Domäne	14
2.3.2	Weitere Domänen des Spastin	14
2.3.3	Strukturähnliche Proteine	15
2.4	Die Ziele dieser Arbeit	15
3	Material und Methoden	17
3.1	Eingesetztes Material.....	17
3.1.1	Laborgeräte und Verbrauchsmaterial	17
3.1.2	Chemikalien.....	17
3.2	Methoden	18
3.2.1	Herstellung der verwendeten Vektoren	18
3.2.1.1	Gewinnung von Spastin-cDNA durch PCR	19
3.2.2	Prüfung der cDNA-Fragmentlängen mittels Elektrophorese	20
3.2.2.1	DNA-Gelelektrophorese	20

3.2.2.2	Aufreinigen des PCR-Produktes aus der Elektrophorese	21
3.2.3	Photometrische Messung der DNA-Konzentration	22
3.2.4	Klonieren der Spastin-cDNA.....	22
3.2.4.1	Einbringen der Spastin-cDNA in den Klonierungsvektor.....	23
3.2.4.2	Transformieren in E. coli.....	23
3.2.4.3	Klonieren in E. coli.....	24
3.2.4.4	Anlegen eines Bakterien-Gefrierstockes	25
3.2.4.5	Aufreinigen der klonierten Spastin-cDNA aus E. coli	25
3.2.5	Sequenzieren der DNA.....	26
3.2.5.1	Sequenzier-PCR	26
3.2.5.2	Sequenzanalyse mit Licor Long Readir 4200.....	28
3.2.6	Mutagenese der Spastin-cDNA	29
3.2.7	Eukaryontische Zellkulturen	31
3.2.7.1	Zelllinien.....	31
3.2.7.2	Wachstums- und Kulturbedingungen	32
3.2.7.3	Anlegen eines Gefrierstockes einer eukaryotischen Zellkultur.....	32
3.2.8	Transiente Transformation eukaryotischer Zellen.....	33
3.2.9	Fixation der Zellen	34
3.3	Immunhistochemische Färbungen.....	34
3.4	Mikroskopische Auswertung mit einem Konfokalem Fluoreszenzmikroskop	35
4	Ergebnisse.....	37
4.1	Kontrollen.....	37
4.2	Transient überexprimierte GFP-Konstrukte	38
4.2.1	GFP-Konstrukte mit Wildtyp-Spastin	38
4.2.2	GFP-Konstrukte mit S44L.....	40
4.2.3	GFP-Konstrukte mit K388R.....	41
4.2.4	GFP-Konstrukte und Spastin-Antikörper	42
4.3	Native Zellen	43
4.3.1	Antikörper gegen Spastin	43
4.4	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	45
5	Diskussion	47
5.1	Lokalisation des Spastins	47
5.2	Kernlokalisierung von Spastin.....	48
5.3	Effekt des Spastins auf α -Tubulin.....	48

6	Schlussfolgerung	51
7	Literatur	52
8	Anhang	59
8.1	Vektoren	59

1 Die subzelluläre Lokalisation und Wirkung auf α -Tubulin von Spastin und den Spastin-Mutanten K388R und S44L in eukaryotischen Zellsystemen.

1.1 Zusammenfassung:

Hereditäre Spastische Paraplegien (HSP) sind eine genetisch und klinisch sehr heterogene Gruppe von neurodegenerativen Erkrankungen, deren gemeinsames Merkmal eine spastische Lähmung der unteren Extremität ist. Der häufigste Vererbungsmodus ist autosomal-dominant. Mutationen im SPG4-Gen stellen die häufigste Ursache für autosomal-dominante HSP-Erkrankungen dar. Dieses Gen codiert Spastin, ein Protein aus der Familie der AAA-Proteine, d.h., es weist eine allen AAA-Proteinen gemeinsame Domäne mit ATPase-Aktivität auf. Wildtyp-Spastin und zwei Mutanten (K388R, S44L) wurden transient als GFP-Fusionsproteine in eukaryotischen Zellsystemen überexprimiert und die subzelluläre Lokalisation mittels anti-Spastin Antikörpern ermittelt. Dabei wurden unterschiedliche Zelllinien verwendet. Dies waren Hela-Zellen, B16-Zellen und ST14A-Zellen, die letztgenannten sind in der Lage, temperaturabhängig neuronal zu differenzieren. Die Mutante (K388R) lokalisiert wie der überwiegende Teil der bekannten HSP-Mutationen innerhalb der AAA-Domäne, während die zweite Mutante (S44L) im N-Terminus liegt. In Vorarbeiten wird eine Microtubuli-Depolymerisation durch Spastin beschrieben. Eine Gegenfärbung der Microtubuli mit Hilfe von Antikörpern gegen α -Tubulin, als einer vermuteten Zielstruktur, sollte die Aufklärung der subzellulären Lokalisation vereinfachen und die in Vorarbeiten beschriebene Depolymerisation der Microtubuli beleuchten. Bei den GFP-Fusionsproteinen mit Wildtyp-Spastin, wie auch bei den beiden Mutanten, wurde ausschließlich eine perinukleäre Lokalisation ermittelt. Bei den Antikörpern gegen natives Spastin hingegen zeigte sich sowohl eine peri- wie intranukleäre Lokalisation. Die derzeitige Datenlage beschreibt eine nukleäre wie zytoplasmatische Lokalisation beim Vorliegen von zwei Isoformen. Beide mit zwei NLS (Nuklear Lokalisation Site), die Kernlokalisierung codieren und eine mit zwei NES (Nuklear Export Site), die es effektiv aus dem Kern schleusen. Die Microtubuli zeigten sich bei überexprimierten GFP-Fusionsproteinen mit Wildtyp-Spastin in allen Zelllinien vermindert. Bei den GFP-Fusionsproteinen mit der S44L-Mutation war nur eine geringe Verminderung und bei denen mit der dominanten K388R-Mutante keine mehr nachweisbar. Wahrscheinlich wirkt das Spastin durch Abbau der Microtubuli regulatorisch auf das Zellskelett.

2 Einführung

2.1 Hereditäre spastische Paraplegie(HSP)

Die Hereditären spastischen Paraplegien (HSP) stellen eine Gruppe von neurodegenerativen Erkrankungen dar, die genetisch wie klinisch sehr heterogen sind. Sie werden durch eine zunehmende Spastizität und Hyperreflexie der unteren Extremität charakterisiert. Fehlen weitere neurologische Symptome spricht man von der „reinen Form“, beim Hinzutreten solcher, wie z. B. Optikusatrophy, Taubheit oder Demenz, von der „komplizierten Form der HSP (Fink et al. 1996). Die reine Form der HSP, die auch im Vererbungsmodus variantenreicher ist, aber meist autosomal-dominant vererbt wird, ist die bei weitem häufigere Form. Innerhalb dieser Gruppe spielt die Spastische Paraplegie Typ 4 die wichtigste Rolle. Die relativ seltene komplizierte Form der HSP mit ihren Begleitsymptomen wird meist in einem autosomal-rezessiven Erbgang vererbt. Jedoch sind für beide Formen autosomal-dominante, autosomal-rezessive und X-chromosomale Vererbungsmodi bekannt (Harding 1993). Die Prävalenz der Erkrankung zeigt starke regionale Unterschiede. Sie reicht nach Region und Studie von 0,9 bis 14 Erkrankungen auf 100.000 Einwohner (Skre 1974, Werdelin 1986).

2.1.1 Klinische Formen der HSP



Abbildung 1: Die Abbildung zeigt die spastische Lähmung der unteren Extremität eines Betroffenen. Die kleineren Bilder dokumentieren das Babinski-Zeichen. (Quelle: Dt. Ärzteblatt Jg 99/ Heft 7)

Das klinische Leitsymptom der HSP ist die fortschreitende spastische Lähmung der unteren Extremität. Das klinisch leicht erfassbare Babinski-Zeichen ist ein Indikator dafür. Hierbei kommt es beim kräftigen Bestreichen der lateralen Fußkante mit Zug über den Ballen zu einer Dorsalflexion der Großzehe (s. Abbildung 1). Selten kann auch eine Spastik der oberen Extremität hinzutreten. Von einer reinen HSP spricht man, wenn die Spastiken nicht von weiteren neurologischen Ausfällen begleitet werden. Treten solche Symptome dazu, die vielgestaltig sein können, wird dies als komplizierte HSP bezeichnet (Fink et al. 1996).

2.1.1.1 Die reine Form der HSP

Im Jahre 1880 wurde der erste Fall einer reinen HSP von dem deutschen Neurologen Adolf von Strümpell beschrieben (Strümpell 1880). Sie stellt die häufigste Form der HSP dar. Hierbei können die Symptome jedoch sehr unterschiedlich ausgebildet sein, die Varianz reicht von asymptomatisch (10-20%) bis gehunfähig (10-15%). Die Degeneration der distalen Axone des ersten Motoneurons, der so genannten Pyramidenbahn, führt zu einer zunehmenden spastischen Einsteifung und Schwäche der Beine und Füße (Reid 1997). Diese Pyramidenbahnschädigung lässt sich mit dem positiven Babinskireflex nachweisen. In geringerer Ausprägung kann die Spastik auch die Arme und den Schultergürtel betreffen.

Die Hälfte der Patienten mit HSP zeigt zudem Störungen des Harndrangs, dies kann die Frequenz, die Drangkontrolle oder auch eine Inkontinenz sein. Weitere häufige Symptome bei Betroffenen sind ein herabgesetzter Vibrationssinn (20-65% der HSP Betroffenen), sowie ein Hohlfuß (30-50% der Patienten) (Fink et al. 1996, Harding 1993, Reid 1997).

Der häufigste Vererbungsmodus der reinen HSP ist autosomal-dominant. Harding unterscheidet nach dem Erkrankungsalter zwei Formen der reinen HSP. Erkrankt der Betroffene vor dem 35. Lebensjahr, entspricht das dem Typ I, bei der die Spastik stärker ausgeprägt ist als die Muskelschwäche und die nur eine langsame Progression zeigt. Ein Erkrankungsbeginn nach dem 35. Lebensjahr zeigt Spastik und Muskelschwäche in gleicher Stärke, öfter distale Sensibilitätsverluste und Blasenstörungen, sowie eine schnellere Progression (Harding 1993).

2.1.1.2 Die komplizierte Form der HSP

Bei der relativ seltenen komplizierten Form der HSP kommen weitere Ausfälle zur Pyramidenbahndegeneration hinzu. Dies umfasst so zahlreiche wie verschiedene Symptome, wie Amyotrophie, Kleinhirnstörungen, Optikusatrophie, sensorische Störungen, Makuladegeneration, Choreoathetose, Dystonien, Pigmentstörungen, Demenz. Die am häufigsten assoziierte Störung ist die Amyotrophie. Hierbei kommt es üblicherweise zur Atrophie der perinealen Muskulatur, sowie zu angeborenen sensorischen und motorischen Neuropathien (Harding 1993, Baraitser et al. 1990).

2.1.2 Pathologie der Erkrankung

Die Degeneration des ersten Motorneurons ist das der HSP zugrunde liegende pathomorphologische Korrelat. Dies geschieht von distal nach proximal. Zusätzlich findet sich häufig noch, dass die Hinterhörner, die die sensorische Qualitäten leiten, nach rostral zugrundegehen. Eine primäre Demyelinisierung wird nicht beobachtet. Auch die Zellkörper selbst zeigen sich meist nicht betroffen (Reid 1997).

2.1.3 Diagnosekriterien

Ein zentrales Kriterium der Diagnosestellung ist die positive Familienanamnese. Ist diese blank, müssen im Sinne einer Ausschlussdiagnose Autoimmunerkrankungen wie multiple Sklerose, neurodegenerative Erkrankungen wie spinozerebelläre Ataxien oder amyotrophe Lateralsklerose, metabolische Störungen wie Vitamin-B12-Mangel, Vitamin-E-Mangel, A-Beta-Lipoproteinämien oder Leukodystrophien, strukturelle Anomalien wie eine Arnold-Chiari-Malformation, degenerative (spondylotische) Wirbelsäulenveränderungen, Syringomyelie, Gefäßfehlbildungen oder Tumoren sowie Infektionskrankheiten wie Neuro-lues, Aids oder die tropische spastische Paraparese ausgeschlossen sein. Die Diagnosekriterien der reinen HSP sind:

1. Spastische Tonuserhöhung der unteren Extremitäten
2. Parese der unteren Extremitäten, in der Regel weniger ausgeprägt als die Spastik
3. Hyperreflexie der unteren Extremitäten
4. Positive Familienanamnese
5. Positives Babinski-Zeichen
6. Blasenentleerungsstörung
7. Leichte Sensibilitätsstörung (reduziertes Vibrations- und Gelenkslageempfinden)
8. Hyperreflexie und Schwäche der oberen Extremitäten
9. Ausschluss sonstiger Erkrankungen

Sind die Kriterien 1-4 und 9 erfüllt, so besteht eine klinisch gesicherte unkomplizierte autosomal-dominante HSP. Sind diese Kriterien mit Ausnahme der positiven Familienanamnese erfüllt, kann auch eine unkomplizierte autosomal-rezessive HSP oder X-gebundene HSP vorliegen (Sauter et al. 2002).

2.1.4 Therapie der Erkrankung

Es ist keine kausale Therapie der HSP bekannt. Eine symptomatische Behandlung kann mit Antispastika und Physiotherapie betrieben werden. Bei schweren Beeinträchtigungen durch entstandene Deformitäten oder Verkürzungen kann auch eine chirurgische Intervention sinnvoll sein.

2.1.5 Epidemiologie der Erkrankung

Die wenigen Studien zur Epidemiologie sind in ihren Ergebnissen uneinheitlich. Dies liegt zum Teil daran, dass die angelegten Diagnosekriterien nicht einheitlich sind. Dennoch scheint es ausgeprägte regionale Unterschiede zu geben. So ermittelte Werdelin in Dänemark eine Prävalenz von 0,9 Erkrankten auf 100.000 Einwohner. Polo fand in Spanien unter 100.000 Einwohner 9,6 Erkrankte und Skre in West-Norwegen 14 HSP-Fälle pro 100.000 Einwohner. Die autosomal-dominant vererbte Form spielt zahlenmäßig die größte Rolle, so waren von den 0,9/100.000 HSP-Fällen in Dänemark 0,8/100.000 autosomal-dominant und in West-Norwegen von den 14/100.000 waren es 12,1/100.000. (Werdelin 1986, Polo et al. 1991, Skre 1974).

2.2 Molekulargenetische Grundlagen der HSP

Es ist sinnvoll, die Erkrankung nach den vorkommenden Vererbungsmustern zu unterteilen. Dies bedeutet eine Unterteilung in einen autosomal-dominanten, einen autosomal-rezessiven und einen X-chromosomalen Erbgang. Die autosomal-dominante HSP stellt bei weitem den größten Anteil der Erkrankungen, gefolgt von autosomal-rezessiven Erbgängen und Einzelfällen von X-chromosomalen. Für alle Vererbungsmodi sind bereits mehrere Genloci bekannt, diese werden Spastic Paraplegia Gene (*SPG*) genannt (s. Tabelle 1). Über diese hinaus werden ständig weitere Genloci für diese Erkrankung identifiziert. Innerhalb der wichtigen Gruppe der autosomal-dominanten HSP findet man gehäuft Mutationen auf dem kürzerem Arm des 2 Chromosoms (Region 2p). Hier findet sich der genotypisch häufigste Grund einer HSP-Erkrankung, eine Mutation im Spastin-Gen (*SPG4*).

	Genlocus	Genprodukt	Vererbungsmodus	HSP-Form
<i>SPG1</i>	Xq28	L1-CAM	X-chromosomal	kompliziert
<i>SPG2</i>	Xq22	PLP	X-chromosomal	kompliziert
<i>SPG3</i>	14q11.2-24.3	Altlastin	autosomal-dominant	Rein
<i>SPG4</i>	2p21-22	Spastin	autosomal-dominant	Rein/kompliziert
<i>SPG5</i>	8p12-q13	Unbekannt	autosomal-rezessiv	Rein
<i>SPG6</i>	15q11.1	NIPA1	autosomal-dominant	Rein
<i>SPG7</i>	16q24.3	Paraplegin	autosomal-rezessiv	kompliziert/rein
<i>SPG8</i>	8q23-24	Unbekannt	autosomal-dominant	Rein
<i>SPG9</i>	10q23.3-24.1	Unbekannt	autosomal-dominant	kompliziert
<i>SPG10</i>	12q13	KIF5A	autosomal-dominant	Rein
<i>SPG11</i>	15q13-15	Unbekannt	autosomal-rezessiv	kompliziert/rein
<i>SPG12</i>	19q13	Unbekannt	autosomal-dominant	Rein
<i>SPG13</i>	2q24-34	HSP60	autosomal-dominant	Rein
<i>SPG14</i>	3q27-28	unbekannt	autosomal-rezessiv	kompliziert
<i>SPG15</i>	14q22-q24	unbekannt	autosomal-rezessiv	kompliziert
<i>SPG16</i>	Xq11.2	unbekannt	X-chromosomal	kompliziert
<i>SPG17</i>	11q12-q14	unbekannt	autosomal-dominant	kompliziert
<i>SPG18</i>	Wird bestimmt	unbekannt	autosomal-dominant	unbekannt
<i>SPG19</i>	9q33q34	unbekannt	autosomal-dominant	Rein
<i>SPG20</i>	13q12.3	Spartin	autosomal-rezessiv	kompliziert
<i>SPG21</i>	15q22.31	Maspardin	autosomal-rezessiv	kompliziert
<i>SPG22</i>	Reserviert			
<i>SPG23</i>	1q24-q32	unbekannt	autosomal-rezessiv	kompliziert
<i>SPG24</i>	13q14	unbekannt	autosomal-rezessiv	Rein
<i>SPG25</i>	6q23.3-q24.1	unbekannt	autosomal-rezessiv	Rein
<i>SPG26</i>	12p11.1-12q14			
<i>SPG27</i>	10q22.1-q24.1	unbekannt	autosomal-rezessiv	Rein
<i>SPG28</i>	14q21.3-q22.3	unbekannt	autosomal-rezessiv	Rein
<i>SPG29</i>	1p31.1-1p21.1	unbekannt	autosomal-dominant	kompliziert

Tabelle 1: Die Tabelle fasst die bisher bekannten HSP-Loci, das Genprodukt, den Vererbungsmodus und die entstehende klinische Form zusammen.

2.2.1 X-chromosomaler Erbgang

Bisher konnten drei Genloci mit der X-chromosomalen HSP in Verbindung gebracht werden. Hierbei handelt es sich um *SPG1* (Jouet et al. 1994), *SPG2* (Saugier-Weber et al. 1994), sowie *SPG16* (Tamagaki et al. 2000). Bei zweien, *SPG1* und *SPG2*, konnte das krankheitsursächliche Protein identifiziert werden. Alle drei führen zu einer komplizierten Form der HSP mit verschiedenen Begleiterscheinungen und Syndromen.

2.2.2 Autosomal-rezessiver Erbgang

Für die autosomal-rezessive Form der HSP sind bisher folgende Loci bekannt: *SPG5* (Hentati et al. 1994), *SPG7* (Casari et al. 1998), *SPG11* (Fink et al. 1995), *SPG14* (Vazza et al. 2000), *SPG15* (Hughes et al. 2001) und *SPG20* (Patel et al. 2002), *SPG21* (Simpson et al. 2003), *SPG23* (Blumen et al. 2003), *SPG24* (Hodgkinson et al. 2002), *SPG25* (Zortea et al. 2002), *SPG27* (Meijeret al. 2004), *SPG28* (Bouslam et al. 2005). Davon sind als Genprodukte das Paraplegin des Gens *SPG7*, das Spartin von *SPG20* und das Maspardin von *SPG21* bekannt. Paraplegin ist ein Protein, dass wie Spastin zur Gruppe der AAA-Proteine zu zählen ist. Mutationen in diesem Gen können sowohl zu einer komplizierten, wie zu einer reinen HSP führen (Settasatian et al. 1999).

2.2.3 Autosomal-dominanter Erbgang

Autosomal-dominant ist die häufigste Vererbungsform der HSP, 70-80% der reinen HSP-Fälle gehen auf diesen Modus zurück (Reid 1997). Gleichzeitig ist sie am stärksten genetisch heterogen. Derzeit sind dafür folgende Loci beschrieben: *SPG3* (Hazan et al. 1993), *SPG4* (Hazan et al. 1994), *SPG6* (Fink et al. 1995), *SPG8* (Hedera et al. 1999), *SPG9* (Seri et al. 1999), *SPG10* (Reid et al. 1999), *SPG12* (Reid et al. 2000), *SPG13* (Fontaine et al. 2000), *SPG17* (Patel et al. 2001), *SPG19* (Valente et al. 2002) und *SPG29* (Orlacchio et al. 2005). Dazu konnten bei einigen Koppelungsversuchen in erkrankten Familien keine der bekannten Loci bestätigt werden, so das weitere wahrscheinlich sind. Es sind sowohl komplizierte wie reine Formen beschrieben (s. Tabelle 1). Als Genprodukte sind identifiziert, das Altlastin von *SPG3* und das Spastin von *SPG4*, sowie in neueren Publikationen, das KIF5A von *SPG10* (Reid et al. 2002), das HSP60 (Hansen et al. 2002) und das NIPA1 bei *SPG6* (Reinier et al. 2003). Mutationen im Spastin sind der häufigste Grund für HSP-Erkrankungen, sie machen etwa 40% der autosomal-dominanten HSP-Erkrankungen aus (Hazan et al. 1999).

2.2.3.1 SPG4 assoziierte HSP

SPG4 ist ein Gen, dessen cDNA, d.h. die intronfreie DNA, sich über 17 Exons, und damit im Genom über etwa 2kb, erstreckt (s. Anhang). Das codierte Protein besteht aus 616 Aminosäuren, das im menschlichen Organismus ubiquitär exprimiert wird. 1999 konnten von Hazan et al. bei HSP-Erkrankten Mutationen in diesem Gen nachgewiesen werden. Bei den bisher gefundenen Mutationen, es sind inzwischen über 100 beschrieben, handelt es sich um Insertionen, Deletionen und Basensubstitutionen. Bei den Basensubstitutionen fanden sich sowohl Missense-, Nonsense- und Splice-Site-Mutationen (Hazan et al. 1999). Das Gen enthält eine Region, die in dieser Form auch bei anderen Genen auftritt. Die so genannten AAA-Proteine (ATPases associated with diverse cellular activities) werden durch das Vorhandensein dieser Region, der AAA-Kassette, als eine Gruppe definiert (s. 1.3.1) (Patel et al. 1998). Ansonsten zeigt das Gen eine Homologie zu Katanin, einem AAA-Protein, das in seiner Funktion bereits besser bekannt ist (s. 1.3.2) (Hartmann et al. 1999). Die *SPG4* assoziierten HSP-Erkrankungen sind in der Regel unkompliziert, nur selten treten bei einigen Familien zusätzlich Symptome, z. B. eine dementielle Entwicklung, hinzu. Die Varianz der Symptome innerhalb der *SPG4*-HSP ist sehr groß. Studien, die versuchten bestimmte klinische Phänotypen Genotypen zuzuordnen, erwiesen sich als erfolglos. Elektrophysiologisch zeigen verschiedene Mutationen des Spastings jedoch charakteristische Unterschiede (Bönsch et al. 2003).

2.3 Merkmale des Spastin-Proteins

Spastin ist als Genprodukt des *SPG4*-Locus identifiziert. Es besteht aus 616 Aminosäuren und weist eine ATPase-Aktivität auf. Es ist damit den AAA-Proteinen (ATPases associated with diverse cellular activities) zuzuordnen. Das gemeinsame Element dieser Gruppe ist das Vorhandensein der AAA-Domäne. Ihre Funktion beim Spastin ist vermutlich die Regulation der ATP-Bindung (Errico et al. 2002). Der Rest des Spastins zeigt eine starke Homologie zum Katanin, das ebenso wie Spastin ein Vertreter der ‚meiotischen‘ Subgruppe der AAA-Proteine ist und für das eine Rolle beim Abbau von Mikrotubuli beschrieben wurde (Hartmann et al. 1999). Mikrotubuli sind ein Baustein zum Aufbau des Zytoskeletts. Auch Studien zum Spastin legen eine solche Funktion nahe, wobei ein Ungleichgewicht des Umsatzes von Mikrotubuli bei Mutationen des Spastins und daraus resultierende Probleme beim

intrazellulären Transport, in der Ätiologie der Erkrankung eine tragende Rolle zu spielen scheint (Errico et al. 2002, McDermott et al. 2003).

Die vor der Durchführung dieser Arbeit vorliegenden Studien zur subzellulären Lokalisation waren widersprüchlich. Es wurde zum einen von einer perinukleären Lage berichtet (Errico et al. 2002, McDermott et al. 2003), zum anderen von einer nukleären Lage (Charvin et al. 2002). Durch Vorhandensein von zwei Startcodons im Spastinogen gibt es zwei Isoformen von Spastin, eine mit 68kDa und eine mit 60kDa (Claudiani et al. 2005).

2.3.1 Die AAA-Domäne

Das gemeinsame Merkmal der Familie der AAA-Proteine, also ATPasen mit verschiedensten Funktionen, ist das Vorhandensein einer Domäne die sich unter den Proteinen dieser Klasse kaum unterscheidet, der AAA-Domäne (Bayer 1997). Diese Domäne enthält ein Walker A (ATP-Bindungsstelle) und B (Mg^{2+} -Bindungsstelle) -Motiv, Leucin-Zipper-Motive und eine Helix-Loop-Helix-Dimerisierungsdomäne (Hazan et al. 1999), es bindet beim Spastin ATP und reguliert unter Verbrauch desselben die Bindung an die Zielstruktur (s. 1.3.2). Beim Katanin, einem dem Spastin sehr homologen AAA-Protein, wird diese Regulation durch die Bildung von Oligomeren ermöglicht (s. 1.3.3). Mit einer Mutation innerhalb dieser Domäne (K388R), die die AAA-Domäne ihrer Funktion beraubt, konnten Errico et al. zeigen, dass das Spastin irreversibel an das Zellskelett band (Errico et al. 2002).

2.3.2 Weitere Domänen des Spastin

Die Bindung des Spastin an die Mikrotubuli erfolgt über das N-terminale Ende des Proteins. Dies konnte von Errico et al. mit einem N-terminal verkürzten Protein nachgewiesen werden. In der Zwischenzeit konnte die Bindungsdomäne genauer bestimmt werden. Diese Domäne wird MIT (microtubule interacting and trafficking molecules) genannt (s. 4.1). (Ciccarelli et al. 2003). Als Bindungspartner sind Altlastin, Reticulon1 und CHMP identifiziert (Mannan et al. 2006, Sanderson et al. 2006, Reid et al. 2004).

Eine weiterführende Arbeit, die auch Material aus dieser Arbeit verwendete, konnte zwei NLS (Nuclear Localisation Site) innerhalb des Spastinproteins bestimmen. Diese dienen dazu einen Übertritt in den Kern zu kodieren (s. 4.1). (Beetz et al. 2004). In der 68kDa Isoform finden sich zwei NES (Nuklear Export Signal), die einen Transport aus dem Kern veranlassen (Claudiani et al. 2005).

2.3.3 Strukturähnliche Proteine

Das p60-Katanin, das ebenfalls zur Gruppe der AAA-Proteine gehört, ist dem Spastin auch außerhalb der AAA-Domäne sehr ähnlich. Es bildet ATP-abhängig Oligomere, die an die Mikrotubuli binden und diese abbauen, Danach werden wieder Katanin-Monomere frei. Dieser Zyklus begünstigt die Bindung an die Zielstruktur, unterstützt die ATP-Utilisation und somit die Funktion. Es wird diskutiert, ob es nicht eine generelle Funktion der AAA-Domäne ist, eine Oligomerisation von AAA-Proteinen zu unterstützen, die unter Nukleotidverbrauch zur Bindung und dem Abbau, bzw. einer anderen Funktion, an ihrer jeweiligen Zielstruktur führt (Hartmann et al. 1999).

2.4 Die Ziele dieser Arbeit

Bei Aufnahme der Arbeit gab es eine sich widersprechenden Datenlage. Unter Verwendung von verschiedenen Zellmodellen, in denen Spastin als Fusionsprotein mit einem fluoreszierenden Protein (Green Fluorescent Protein, GFP) verbunden war und transient überexprimiert wurde, konnten Errico et al. eine perinukleäre Lokalisation dieses Fusionsproteins nachweisen. Die Markierung von Tubulin mit entsprechenden Antikörpern bestätigte eine gemeinsame Lokalisation. Es zeigte sich eine gemeinsame Lokalisation sowohl mit α -, wie auch γ -Tubulin-Antikörper, die besonders nahe am Zentrosom binden. Die Mutante K388R liegt innerhalb der AAA-Domäne und nimmt dieser die Fähigkeit ATP umzusetzen, was zum Auflösen der Bindung nötig wäre. Mit Hilfe von Tubulin-Antikörpern konnte die Arbeitsgruppe eine Reduktion von Mikrotubuli in Zellen, die Spastin-GFP überexprimierten nachweisen (Errico et al. 2002, McDermott et al. 2003).

Die Arbeitsgruppe von Charvin et al. arbeitete mit polyklonalen Peptidantikörpern gegen Spastin in neuronalen Zellen bzw. Geweben. Obwohl ubiquitär exprimiert, erreicht dieses Protein einen besonders hohen Spiegel im Hirngewebe. Hier spezifisch in Neuronen, besonders in denen des Kortex und des Striatums. Unter Einsatz der polyklonalen Peptidantikörper wird eine ausschließliche nukleäre Lokalisation des Spastins beschrieben. Eine besonders starke Spastinexpression konnte in Rückenmarkszellen von Mäusen nachgewiesen werden.

In dieser Arbeit werden zwei Isoformen von Spastin, wovon bei einer das Exon 4 herausgespliced ist, in gewebespezifischen Verhältnissen zueinander beschrieben. Im Gehirn findet sich relativ gehäuft die Variante mit Exon 4. In ihrer Veröffentlichung erörtern sie die

Möglichkeit einer Haploinsuffizienz bei Spastinmutationen, d.h. die Mutationen führen zu einer Reduktion des funktionierenden Spastins, das dann nicht ausreicht um seine Funktion zu erfüllen (Charvin et al. 2002).

Mit überexprimierten Spastin-GFP Konstrukten und Antikörper gegen Spastin in verschiedenen eukaryotischen Zellsystemen sollte die Lokalisation näher beleuchtet werden. Es kam dabei auch eine Zelllinie zum Einsatz, die neuronal differenzieren kann (St14A).

Eng mit der Lokalisation zusammenhängend ist die Funktion. Eine Anfärbung von Microtubuli in den eingesetzten Zelllinien diene zur Darstellung des Einflusses von Spastin und den Spastin-Mutanten auf diesen Teil des Zellskeletts.

3 Material und Methoden

3.1 Eingesetztes Material

3.1.1 Laborgeräte und Verbrauchsmaterial

Autoklav: Varioklav	H+P, Oberschleißheim
Vortexer: Vortex 2	Scientific Inc, New York (USA)
Zentrifugen: Centrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
Universal 16K	Hettich, Söllentruna (SW)
Elektrophoresekammer: Supersub	Hofer, San Francisco (USA)
DNA-Spektrometer: Gene Quant II	Pharmacia Biotech,
Sequenzierer: Long Readir 4200	Licor, Ebersberg
Wärmeschrank	Heraeus, Hanau
Wärmeschüttler: Typ 3033	GFL, Großburgwedel
Sterilbank:	Holten, Allerod (DN)
PCR-Block: TouchDown	Hybaid, Heidelberg
Stickstofftank	Messer, Krefeld
Konfokales Lasermikroskop: LSM 510	Zeiss, Jena
Pipetten	Lab-Systems, Virginia (USA)
Petrischalen (40x12mm)	Nunc, Wiesbaden
Gefäße (1,5ml, 2ml, 5ml, 10ml)	Eppendorf, Hamburg
Kryotubes	Lab-Tek, Christchurch (NZ)
Mikrowellplatten	Costen, New York (USA)

3.1.2 Chemikalien

Optimem	Gibco, Eggenstein
Einfriermedium	Gibco, Eggenstein
PBS (Phosphat Buffered Saline)	Gibco, Eggenstein
Isopropanol	Gibco, Eggenstein
70%Ethanol	Gibco, Eggenstein
MgCl ₂	Gibco, Eggenstein
Tris –HCL	Gibco, Eggenstein
EDTA	Gibco, Eggenstein

Gelatine	Gibco, Eggenstein
Glycerin	Gibco, Eggenstein
Tris-Puffer	Gibco, Eggenstein
Formamid	Gibco, Eggenstein
Brohmphenol	Gibco, Eggenstein
Trypsin	Gibco, Eggenstein
β -Mercaptoethanol	Gibco, Eggenstein
TritonX 100	Gibco, Eggenstein
Ethidiumbromid	Gibco, Eggenstein
dNTPs,	Genecraft, Münster
ddNTPs,	Genecraft, Münster
DNA-Polymerase	Genecraft, Münster
Agarose	Genecraft, Münster
Loading Dye	Amersham, Freiburg
Wachs	Biozym, Oldendorf
T4 DNA-Ligase	Invitrogen, Karlsruhe
Shrimp Phosphatase	Roche, Mannheim
Desphosphorylase	Roche, Mannheim

3.2 Methoden

3.2.1 Herstellung der verwendeten Vektoren

Die cDNA des Spastings wurde aus einer kommerziellen cDNA-Bank (Clontech, Palo Alto, USA) mithilfe geeigneter Oligonukleotide unter Generation einer HindIII-bzw. BamHI-Restriktionsschnittstelle und gleichzeitiger Deletion des Stoppcodons amplifiziert. Das 1,8 kb große Produkt wurde über HindIII/BamHI in den Vector pbluescript II SK integriert und zur Verifizierung der korrekten Basenabfolge komplett sequenziert. Das HindIII/BamHI-Fragment wurde anschließend in den Expressionsvektor pEGFP-N3 kloniert. Durch die Deletion des Spastin-Stoppcodons wurde nach Transfektion in eine eukaryotische Zelle ein Fusionsprotein aus Spastin und GFP gebildet. Die Herstellung spezieller Spastinmutanten (K388R und S44L) erfolgte im pbluescript-Vektor mit Hilfe des QuikChange Site directed mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA). Nach erfolgter Mutagenese wurde die Sequenz durch Sequenzierung verifiziert und das mutierte Gen ebenfalls in den

eukaryotischen Expressionvector pEGFP-N3 über die Schnittstellen HindIII und BamHI integriert.

Die einzelnen Verfahren sind im folgendem beschrieben.

Material: pBluescript II SK(+/-)
 pEGFP-N3 Vector (Clontech Cat-Nr. 6080-1)
 pEGFP-C1 Vector (Clontech Cat-Nr. 6084-1)
 - Eine Kartierung der Vektoren befindet sich im Anhang

3.2.1.1 Gewinnung von Spastin-cDNA durch PCR

Das Prinzip der PCR (Polymerase Chain Reaction) beruht auf der Fähigkeit von DNA-Polymerasen einen existenten DNA Einzelstrang von einem hybridisiertem Oligonukleotid aus, dem Primer, zu einem Doppelstrang zu vervollständigen. Durch mehrmaliges Wiederholen der Einzelschritte der PCR, d.h. DNA-Denaturierung, Hybridisieren der Oligonukleotidprimer und anschließender Polymerasereaktion, kann eine exponentielle Anreicherung der gewünschten DNA erreicht werden. Aus diesen unterschiedlichen DNA Fragmenten wird mit Hilfe eines geeigneten DNA-Primerpaares im Ansatz, das gewünschte DNA-Stück im weiteren Verlauf der PCR amplifiziert.

Material:	PCR-10xAnsatz:	75µl Aqua dest.
		12µl 10xPuffer
		5µl dNTP (pro Nukleotid 10mM)
		5µl MgCl ₂ (50mM)
		1µl Primer1 (2pm/µl)
		1µl Primer2 (2pm/µl)
	Hotstart-Mix:	26µl Aqua dest.
		3µl 10xPuffer
		1,2µl Taq-Polymerase
	10xPuffer:	100mM Tris –HCl
		500mM KCl
		15mM MgCl ₂
		0,1% Gelatine, pH8,2

PCR- Primer	Hybridisierungs- temperatur:
1: 5`-TTCCCGTCGGTCTGCGGGAGGCGGG-3`	56°C
2: 5`-GTAGACTGTAACTTCTTCCTGATG-3`	56°C

Durchführung: Zu den 3µl der Spastin-DNA aus der Genbank wurden 10µl des PCR-Ansatzes hinzupipettiert und dieser Ansatz mit 10µl Wachs verschlossen.

Das Programm des PCR-Blockes bestand aus drei Teilen:

1. 94°C für 3 Minuten
2. die folgenden drei Temperaturstufen wiederholten sich 35mal
 - 94°C für 30 Sekunden (DNA-Denaturierung)
 - 56°C für 30 Sekunden (Hybridisierung der Primer)
 - 72°C für 30 Sekunden (Elongation der DNA-Kette)
3. 72°C für 3 Minuten

Zum Ende der ersten Heizstufe von 3 Minuten wurden 3µl des Hotstartmixes in den Ansatz pipettiert.

2µl des PCR-Produktes wurden zur Längenbestimmung mittels Gelelektrophorese benötigt.

3.2.2 Prüfung der cDNA-Fragmentlängen mittels Elektrophorese

3.2.2.1 DNA-Gelelektrophorese

Bei neutralem pH sind Nukleinsäuren durch ihre Ladung tragenden Phosphodiesterückgrate vielfach negativ geladen, so genannt polyanionisch. Bedingt durch die Porengröße bewegen sich große Moleküle langsamer im elektrischen Spannungsfeld eines Agarosegels als kleinere. Mit Hilfe eines mitlaufenden, normierten Standards kann so die Länge von DNA-Fragmenten bestimmt werden. Um die einzelnen Laufbanden sichtbar zu machen, wird das Gel nach der Elektrophorese in Ethidiumbromid inkubiert, das in die DNA interkaliert und unter UV-Licht fluoresziert. Für diese Arbeit wurden Kammern verwendet, bei denen das Gel komplett von einem Laufpuffer umschlossen ist, die so genannte SAGE (submerged agarose gel electrophoresis).

Material:	50xTAE-Puffer:	242g Tris-Puffer 14,7g EDTA 57,1ml Eisessig
	Gelmix für Elektrophorese:	1,5g Agarose 100ml TAE-Puffer
	Elektrophorese Loading Buffer:	4g Sucrose 2M TrisHCL 0,25M EDTA 4mg Brohmphenol
	Ethidiumbromid-Stocklösung:	10mg Ethidiumbromid/ 1 ml H ₂ O

Durchführung: Der vorbereitete Gelmix wurde in einer Mikrowelle kurz zum Kochen gebracht und sofort in die Formschale für die Elektrophoresekammer gegossen. Nach dem Einstecken des Kammes, der schmale Kammern in das Gel modelliert, konnte das Agarosegel aushärten. In eine solche Kammer wurden anschließend 20µl des PCR-Produktes und 3µl Loading Buffer hinzupipettiert. Der Laufpuffer wurde durch Verdünnung aus 50xTAE-Stammlösung hergestellt. Die Elektrophoresekammer wurde damit befüllt bis das Gel vollständig vom Puffer umschlossen war. An die Elektroden der Kammer wurde ein Spannung von 85 Volt für 30 Minuten angelegt. Nach deren Ablauf wurde das Gel aus der Kammer entnommen und in einer Lösung aus 100µl der Ethidiumbromid-Stocklösung auf 1l Aqua dest. für 15 Minuten lichtgeschützt inkubiert. Unter UV-Licht konnten die einzelnen Banden sichtbar gemacht werden. Die Bande der gewünschten Länge, hier 2,2 Kb, musste sorgfältig mit einem Skalpell ausgeschnitten und die darin enthaltene DNA aufgereinigt werden.

3.2.2.2 Aufreinigen des PCR-Produktes aus der Elektrophorese

Material:	Zymo Zymoclean Gel Extraction Kit (Cat.-Nr. 04001)
	enthält: ADB-Puffer Waschpuffer

Durchführung: Vor Beginn musste dem Waschpuffer 24µl 100%iges Ethanol zugefügt werden. Die ausgeschnittene Gelbande wurde in einem 1,5ml Tube mit dem dreifachen Volumen an ADB-Puffer vermischt und bei 55°C für 10 Minuten zur vollständigen Lösung inkubiert. Die Lösung wurde auf die Reinigungssäule aufgetragen und bei 15.000g für 10 Sekunden in ein 2ml Gefäß zentrifugiert, das Zentrifugat wurde verworfen. In einem neuen 2ml Gefäß musste die Säule von Gelresten gereinigt werden. Dies geschah durch zweimaliges Auftragen von jeweils 200µl Waschpuffer und Zentrifugieren bei 15.000g für 10 Sekunden. Um letzte Waschpufferreste aus der Säule zu beseitigen, wurde noch einmal bei dieser Geschwindigkeit für 30 Sekunden zentrifugiert. Auch dieses Zentrifugat konnte verworfen werden. Letztendlich konnte nach Auftragen von 6µl Aqua dest. auf die Säule und kurzem zentrifugieren in ein frisches 1,5ml Gefäß, das PCR-Produkt gewonnen werden.

3.2.3 Photometrische Messung der DNA-Konzentration

Die Messung der Konzentration von DNA erfolgte mit dem DNA-Spektrometer. Dieses misst die Absorption bei 260nm und kann bei bekannter Verdünnung daraus die Konzentration der Nukleinsäurelösung bestimmen.

3.2.4 Klonieren der Spastin-cDNA

Für die zwei folgenden Punkte wurde das Invitrogen TOPO TA Cloning Kit verwendet. In Escherichia coli-Zellen wurde über einen Vektor, ein DNA-Stück eingeführt. Der pCR4-TOPO-Vektor ist ein zyklischer DNA-Doppelstrang bekannter Sequenz und bestimmter Eigenschaften (s. Anhang). Er wird unter Nutzung des zelleigenen Enzymsystems der Bakterie repliziert und auch bei Zellteilungen weitergegeben. So enthalten bei einer erfolgreichen Aufnahme dieses Vektors in die Zelle, der so genannten Transformation, alle Tochterzellen, die Klone, ebenfalls diesen Vektor. Durch die kurze Generationszeit von E. coli kann die DNA-Menge schnell vermehrt und durch chemische Aufreinigung wiedergewonnen werden.

3.2.4.1 Einbringen der Spastin-cDNA in den Klonierungsvektor

Um in den Wirt transformiert zu werden, muss die Spastin-cDNA in einen geeigneten Vektor legiert werden. Der innerhalb des Kits angebotene Vektor, der pCR4-TOPO-Vektor (s. Anhang), verleiht dem Bakterium Resistenz gegen Ampicillin, das somit als Selektionsmarker dient. Die in der PCR verwendete Taq-Polymerase fügt an den 3'-Enden der DNA Adenosin Überhänge an, mit deren Hilfe das DNA-Fragment in den Vektor legiert werden kann.

Material: Invitrogen TOPO TA Cloning Kit (Cat.-Nr. K4575-J10)
Enthält: 10xPuffer: 100 mM Tris-HCl, pH 8.3 (bei 42°C)
500 mM KCl
25 mM MgCl₂
0.01% Gelatine
dNTPs: 12.5 mM dATP; 12.5 mM dCTP
12.5 mM dGTP; 12.5 mM dTTP
neutralisiert bei pH 8.0 in Aqua dest.
Salzlösung: 1.2 M NaCl
0.06 M MgCl₂
M13Forward Primer: 0.1 µg/µl in TE Puffer
M13Reverse Primer: 0.1 µg/µl in TE Puffer

Durchführung: 4µl des frischen PCR-Produktes wurden mit je 1µl Salzlösung und TOPO-Vektor zusammenpipettiert, vorsichtig vermischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde sofort auf Eis verbracht und es wurde mit der Transformation in die kompetenten E. coli Zellen weiterverfahren.

3.2.4.2 Transformieren in E. coli

Material: Invitrogen TOPO TA Cloning Kit (Cat.-Nr. K4575-J10)
LB-Medium: 1% Trypton
0,5% Hefeextrakt
0,5% NaCl
pH 7,2 einstellen

für Klonierungsplatten:	1l LB-Medium
(in einer Petrischale)	15g Agar-Agar
	1ml Ampicillin
	2ml X-Gal
	2ml JPTG

Durchführung: Dieser Schritt benötigte auf 37°C vorgewärmtes LB-Nährmedium und zwei ebenfalls auf 37°C vorgewärmte Klonierungsplatten mit 1‰ Ampicillin, sowie ein vorsichtig auf Eis getautes Röhrchen mit den „One Shot“-E. coli-Zellen des Kits. 2µl der Reaktion aus 2.2.4.1 wurden vorsichtig in das Röhrchen mit den E. coli-Zellen pipettiert. Dies wurde für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 30 Sekunden in einem Wasserbad bei 42°C einem „Hitzeschock“ ausgesetzt und sofort auf Eis verbracht. Nach der Zugabe von 250µl des vorgewärmten LB-Mediums, wurde das Röhrchen mit den Zellen für eine Stunde bei 200 U/min und 37°C in einen Schüttelinkubator inkubiert. Zuletzt wurde auf eine der vorgewärmten Klonierungsplatten 150µl des Röhrcheninhalts mit einem sterilen Glasspatel ausgestrichen und auf die andere 100µl. Die Platten wurden 12h in einem Brutschrank bei 37°C inkubiert.

3.2.4.3 Klonieren in E. coli

Material: LB-Medium: 1% Trypton
0,5% Hefeextrakt
0,5% NaCl
pH 7,2 einstellen

Durchführung: Von den Platten wurden insgesamt zehn Kolonien ausgewählt und mit Hilfe von autoklavierten Zahnstochern „gepickt“. Die Kolonien wurden mit einem Zahnstocher betupft und dieses dann in ein steriles 10ml-Gefäß mit 3ml auf 37°C vorgewärmtes LB-Medium mit 1‰ Ampicillin überführt. Diese zehn Gefäße wurden über Nacht in einen Schüttelinkubator gestellt und dort bei 37°C und 200U/min inkubiert. Nach Anlegen eines Gefrierstockes konnte die DNA aufbereitet werden.

3.2.4.4 Anlegen eines Bakterien-Gefrierstockes

Mit Hilfe von zellstrukturschützendem Glycerin ist es möglich Bakterien-Klone auf Dauer zu lagern.

Durchführung: Die Flüssigkulturen wurden bei 4000U/min und bei 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Der über dem Zellpellet entstandene Überstand wurde abgegossen. Nach einer Minute ruhigen Stehens, wurde 1ml des zusammengelaufenen Restüberstandes in 1,5ml Glycerin pipettiert und gründlich mit einem Vortexer gemischt. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

3.2.4.5 Aufreinigen der klonierten Spastin-cDNA aus E. coli

Material: Quiagen Plasmid Mini Kit (Cat.-Nr. 12125)

enthält: Puffer P1:

Puffer P2

Puffer P3

Puffer QBT

Puffer QC

Puffer QF

70% Ethanol

TE-Puffer (pH 8)

Durchführung: Der Puffer P3 wurde vor Beginn auf Eis gekühlt. Das Zellpellet aus dem vorhergehenden Punkt wurde in 300µl des Puffers P1 vollständig aufgelöst, dazu 300µl des Puffers P2 hinzugefügt und bei Zimmertemperatur 5 Minuten inkubiert. Der Zugabe von 300µl des gekühlte Puffer P3 folgten 5 Minuten Inkubation auf Eis. Hiernach wurde die Lösung für 10 Minuten bei 15.000g zentrifugiert. In dieser Zeit wurden die im Kit enthaltenen Trennsäulen in frische 10ml Gefäße gesetzt und durch passives Durchspülen mit 1ml des Puffers QBT kalibriert. Mit dem Ende der Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert und auf die Säule gegeben. Nachdem dieser passiv durchgelaufen war, wurde die Säule vier Mal mit 1ml des

Puffers QC gespült. Die Säule wurde erneut in ein frisches 1,5ml Gefäß gestellt und die DNA konnte durch Zugabe von 800µl des Lösungspuffers QF aus der Säule gelöst werden. Die Säule wurden verworfen. Zu der DNA im Lösungspuffer wurden 560µl Isopropanol mit Raumtemperatur zugefügt und sofort bei 15.000g für 30 Minuten zentrifugiert. Hierbei fiel die DNA aus, der Überstand wurde abgegossen. Nach einem Waschschrift mit 70% Ethanol wurde die DNA in 100µl TE-Puffer mit dem pH 8,0 gelöst.

3.2.5 Sequenzieren der DNA

Die DNA-Sequenz wurde mit Hilfe der so genannten Didesoxy-Sequenzierung (Sanger-Coulson-Sequenzierung) durchgeführt. Dabei wird analog zur PCR ein DNA-Einzelstrang, beginnend an einem geeigneten Primer, kopiert. Hierbei liegt aber in separaten Ansätzen jeweils eins der vier Nukleotide (dNTPs) zum kleinen Teil als Didesoxynukleotid (ddNTPs) vor, d.h. am 3'-Ende fehlt die Hydroxylgruppe zur Polymerisation. Dies führt zum Kettenabbruch. Die Konzentration der ddNTPs ist jedoch so gering, dass nur relativ selten eine Integration erfolgt. So entsteht eine Serie von Fragmenten, die alle mit dem jeweiligen ddNTP enden. Alle Ansätze zusammen ergeben so eine ineinander geschachtelte Fragmentreihe. Diese kann elektrophoretisch aufgetrennt und ausgewertet werden. Hierzu sind die verwendeten Primer mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert, d.h. sie reagieren auf Anregung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge.

3.2.5.1 Sequenzier-PCR

Material: Sequenz-PCR Ansatz: 12µl H₂O

1µl DMSO (Dimethylsulfoxid)

1µl Sequenzierprimer (2pmol/µl)

10µl DNA

Basenmix:

Hotstartmix: 24,5µl H₂O

3µl Puffer

2,5µl Taq-Polymerase

Loading Dye

Basenmix:	Hybridisierungs-
Sequenzierungsprimer	temperatur:
T3: 5'- AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG -3'	56°C
2s: 5'- TAC TTT CAT CTG CAA CAC AAT -3'	56°C
4s: 5'- CGA GTA CAT CTC CAT TGC C -3'	56,7°C
6s: 5'- TGT GGA CAG CAA CCT TGC -3'	56°C
7s: 5'- GGT CTT GTG GCC TAT TAG TTG C -3'	58,9°C
8s: 5'- TGG ATA CTC AGG AAG TGA CC -3'	56°C
11s: 5'- GCA GAA TCG AAT GCA ACC TTC -3'	56°C
M13rev: 5'- CAG GAA ACA GCT ATG ACC -3'	55°C

- bis auf 4s sind alle Sequenzierungsprimer mit dem Farbstoff IRD 800 markiert,
4s ist mit dem Farbstoff IRD 700 markiert

Durchführung: Zunächst wurde ein Ansatz mit 10µl der DNA vorbereitet. In einer 96-Well-Platte wurden danach je 2µl der Basen, diese enthielten bereits die Polymerase und einen passenden Puffer, in getrennte Well's pipettiert. Sofort wurden je 5µl des beschriebenen PCR-Ansatzes auf die 4 Well's pipettiert, jedes Well mit 10µl Wachs verschlossen und in einen PCR-Block gegeben. Das Programm lautete:

1. 94°C für 3 Minuten
2. die folgenden drei Heizstufen wiederholten sich
35mal
94°C für 30 Sekunden
Hybridisierungstemp. des Primers für 30 Sekunden
72°C für 30 Sekunden
3. 72°C für 3 Minuten

Nach dem Ende des Programms wurde in jede Reaktion 5µl Loading Dye gegeben, für 3 Minuten bei 94°C denaturiert und die Platte mit den Reaktionen sofort auf Eis verbracht.

3.2.5.2 Sequenzanalyse mit Licor Long Readir 4200

Material:	Gelmix für Sequenzierer:	12,6g Urea 4,2ml Long Ranger Solution 3,6ml 10xTBE-Puffer auf 30ml mit aqua dest. Auffüllen
	10xTBE-Puffer:	108g Trisbase 55g Borsäure 10g EDTA
	Loading-Buffer:	950µl Formamid 100µl 10x TBE-Puffer 0,1µl Bromphenolblau
	Loading Dye	

Durchführung: Zur Vorbereitung der Sequenzierung musste das Sequenziergel zwischen zwei vollständig und rückstandslos gereinigte Glasplatten in einer speziellen Halte- und Aufhängevorrichtung gegossen werden. Im noch flüssigen Zustand wurde ein Kamm in das Gel gesteckt und bildete so Taschen aus. Das Gel durfte im Anschluss aushärten. In der Maschine wurden beide Enden des Gels von Laufpuffer umspült. Über dieses wurde auch die Spannung am Gel angelegt. Zur Einstellung der angelegten Spannung und der Konfiguration der Laser wurden die vom Hersteller empfohlenen Werte verwendet. In die im Gel

ACTG ACTG

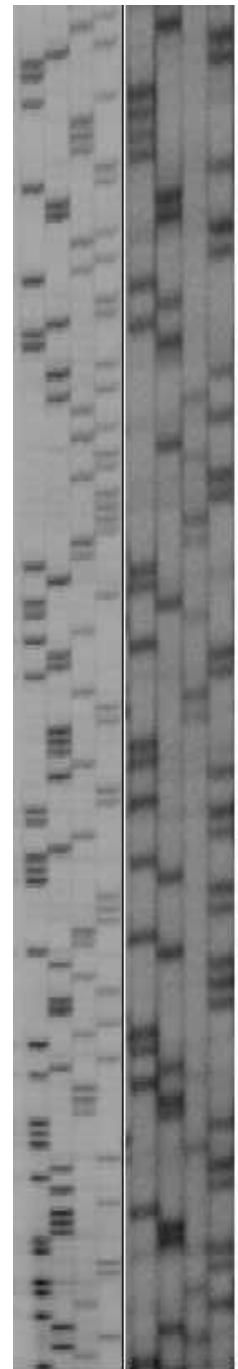


Abbildung 2: Hier sind zwei Sequenzabschnitte gezeigt. Links mit 5s, rechts mit M13rev als Primer.

präformierten Taschen wurden je 3µl der auf Eis gelegten Sequenzreaktionen pipettiert. Durch die angelegte Spannung wanderten die Banden, die sich in ihrer Länge immer um ein Nukleotid unterschieden, durch das Gel. Hierbei wurden diese mit Hilfe der markierten Primer von einem Laser detektiert. Mit Hilfe eines angeschlossenen Rechners konnte ein fortlaufendes Bild der durch das Gel laufenden Banden erstellt werden (s. Abbildung 3). Mit diesem konnte dann die Sequenz des untersuchten DNA-Stückes ermittelt werden.

3.2.6 Mutagenese der Spastin-cDNA

Bei der in dieser Arbeit verwendeten „site-directed mutagenesis“ wird durch entsprechend konzipierte Primer mit Hilfe einer PCR eine Veränderung der Basenfolge bewirkt. Hier wurden Punktmutationen eingeführt, die zu einem Aminosäureshift führten. Bei dieser Methode wird das restliche Gen mit dem Vektor unverändert übernommen. In *E. coli* klonierte DNA wird von den Bakterien methyliert. Die durch die Mutagenese entstandene DNA weist keine Methylierungen auf. Dadurch ist es möglich durch ein spezielles Restriktionsenzym nur die methylierte, unveränderte DNA abzubauen.

Material: Stratagene QuikChange XL (Cat-Nr. 200517)

Im Kit: XL 10-Gold Ultracompetent Cells

enthält: PfuTurbo DNA-Polymerase

QuikSolution

DpnI (Restriktionsendonuklease)

10xReaktionspuffer: 100mM KCL

100mM (NH₄)₂SO₄

200mM Tris-HCL (pH 8,8)

20mM MgSO₄

1% Triton X-100

1mg/ml Bovine Serum Albumin (BSA)

Klonierungsplatten: 1l LB-Medium

15g Agar-Agar

1‰ Ampicillin

2‰ X-Gal

2‰ JPTG

LB-Medium: 1% Tripton
0,5% Hefe
0,5% Kochsalz
pH 7,2 einstellen

Primer für die Mutagenese

S44L:

Primer1:

5'- GCCCCTCCGCCCCGAGTTGCCGCATAAGCGGAAC -3'

Primer2:

5'- CGGGGAGGCGGGCTCAACGGCGTATTCGCCTTG -3'

K388R:

Primer1:

5'- CTGGGAATGGGAGGACAATGCTGGC -3'

Primer2:

5'- GACCCTTACCCTCCTGTTACGACCG -3'

Durchführung: Der verwendete Ansatz zur PCR enthielt: 5µl des 10xReaktionspuffer, 10ng der Spastin-Vektor-DNA, je 125ng der für die Mutation benötigten Primer, 1µl dNTP-Mix und 3µl QuikSolution. Der Ansatz wurde mit Aqua dest. auf ein Volumen von 50µl aufgefüllt. Nach dem Zugabe von 1µl PfuTurbo-Polymerase, wurde die angesetzte Reaktion mit 30µl Wachs versiegelt und sofort in einen PCR-Block verbracht. Das verwendete Programm lautete wie folgt:

1. 95°C für eine Minute
2. die folgenden drei Temperaturschritte wiederholten sich 18mal:
 - 95°C für 50 Sekunden
 - 60°C für 50 Sekunden
 - 68°C für 5 Minuten
3. 68°C für 7 Minuten

Nach Beendigung des Programms wurde die Reaktion sofort 2 Minuten auf Eis verbracht. Anschließend wurde durch Zugabe von 1µl des Restriktions-enzym Dpn I und einstündiger Inkubation bei 37°C, die methylierte DNA

abgebaut. 45µl der im Kit enthaltenen Zellen (XL 10-Gold Ultracompetent Cells) wurden vorsichtig auf Eis aufgetaut. Hierzu wurden dann 20µl des verdauten PCR-Produktes gegeben. Nach 30 Minuten auf Eis, wurde der Ansatz 45 Sekunden lang im Wasserbad 42°C ausgesetzt. Nach 2 Minuten auf Eis wurden 500µl auf 42°C erwärmtes LB-Medium zugegeben und für eine Stunde bei 230 U/min und 37°C in einen Schüttelinkubator verbracht. Nach dieser Zeit wurden je 250µl auf eine Klonierungsplatte ausgestrichen und im Brutschrank bei 37°C für 24 Stunden inkubiert. Die DNA der gewachsenen Kolonien wurde aufgereinigt und sequenziert.

3.2.7 Eukaryontische Zellkulturen

Im Gegensatz zu den prokaryotischen Organismen wie E. coli besitzen Eukaryonten einen von einer Membran umschlossenen Zellkern, sowie verschiedene andere Organellen. Da einige eukaryontische Gene in Prokaryonten deshalb nicht vollständig funktionieren, ist es sinnvoll sie in eukaryontischen Zellsystemen einzusetzen. Zusätzlich haben wir, da die HSP eine das Nervensystem betreffende Krankheit ist, eine Zelllinie eingesetzt, die in der Lage ist neuronal zu differenzieren.

3.2.7.1 Zelllinien

HeLa-Zellen sind Zervixkarzinom-Zellen, die ihre begrenzte Teilbarkeit im Gegensatz zu üblichen differenzierten Zellen verloren haben. Den Namen 'HeLa' haben sie nach den Initialen der Spenderin. Wegen ihrer Teilungsfreudigkeit und einfachen Kultivierung erfreuen sie sich hoher Beliebtheit in der Gentechnik.

B16-Zellen sind Melanomzellen, die aus der Maus gewonnen wurden. In der Handhabung und der Kultivierung sind sie den HeLa-Zellen ähnlich.

St14A wurden aus den striatalen Vorläuferzellen von Rattenembryos gewonnen. Sie wurden immortalisiert und mit einer Antibiotikaresistenz versehen. Bei einer Temperatur von 33°C proliferieren die St14A-Zellen, während sie bei einer Temperatur von 39°C die Proliferation stoppen und differenzieren. Dies geschieht sowohl in eine gliale wie neuronale Richtung, wobei die neuronale Differenzierung bevorzugt ist.

Material: HeLa-Zellen
 B16-Zellen
 St14A-Zellen

3.2.7.2 Wachstums- und Kulturbedingungen

Alle Arbeiten mit den Zellen wurden zur Vermeidung von Kontaminationen in einer sterilen Werkbank mit sterilen oder autoklavierten Geräten und Lösungen durchgeführt. Hela- und B16-Zellen wurden bei 37°C, 5% CO₂ und gesättigter Wasserdampfatmosphäre kultiviert. Die St14a-Zellen wurden bei 33°C und 39°C, unter ansonsten gleichen Bedingungen wie die beiden anderen Zelllinien, kultiviert. Das Passagieren der Zellen erfolgte unter Verwendung von Trypsin. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit einer Neubauer-Zählkammer.

Material:	Für Hela Zellen:	RPMI 10% Fötales Kälber Serum (FCS) 1% Streptomycin/Penicillin
	Für B16– und St14A Zellen:	DMEM (Dulbeccos Modified Eagle Medium) 10% Fötales Kälber Serum (FCS) 1% Streptomycin/Penicillin
	Trypsin	

Durchführung: Zum Umsetzen der Zellen wurde das Medium aus der Kulturflasche entfernt und die 550ml Kulturflasche mit 10ml und die 250ml Flasche mit 5ml Trypsin befüllt. Die abgelösten Zellen wurden mit dem Trypsin bei 800U/min für 10 Minuten und bei ca. 20°C zentrifugiert. Der Trypsinüberstand über dem entstandenen Zellsediment wurde entfernt und durch die selbe Menge des passenden Vollmediums ersetzt. Anschließend wurden die Zellen in einer 1/10-Verdünnung gezählt und in der gewünschten Dichte in vorgewärmtes Nährmedium gesät.

3.2.7.3 Anlegen eines Gefrierstockes einer eukaryotischen Zellkultur

Zur Langfristigen Lagerung der Zellen ist es nötig diese in einem Einfriermedium in flüssigem Stickstoff bei –80°C zu lagern.

Material:	Trypsin
	Einfriermedium (Gibco, Eggenstein)
	Kryotube

Durchführung: Die Zellen wurden nach Absaugen des Mediums mit Trypsin abgelöst, die 550ml Kulturflasche mit 10ml und die 250ml Kulturflasche mit 5ml. 10 Minuten mit 800U/min bei ca. 20°C zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Der Zellbestand einer 550ml Kulturflasche wurde in 500µl Einfriermedium in einem Kryotube resuspendiert und stufenweise heruntergekühlt bis -80°C. Bei dieser Temperatur wurden die Zellen in den Stickstofftank verbracht.

Zum Anlegen einer neuen Kultur wurden die Zellen so schnell wie möglich aufgetaut und in ihrem vorgewärmten Nährmedium gelöst.

3.2.8 Transiente Transformation eukaryotischer Zellen

Um das Spastin als Protein exprimieren zu können, wurde das gentragende Plasmid in die Zellen transfiziert. Da eukaryotische Zellen DNA nicht effizient aufnehmen, muss die DNA mit einem Transfektionsreagenz vorinkubiert werden. In dieser Arbeit wurde Lipofektamin eingesetzt.

Material: Lipofektamin (Invitrogen, Karlsruhe)
OptiMEM
Objektträger mit Kammern

Durchführung: Um die mikroskopische Auswertung zu vereinfachen, wurden die Zellen zunächst in Glasobjektträgern mit einem entfernbaren Kammeraufbau angezüchtet. Hierbei wurden beim 8-Kammerträger pro Kammer 14.000 Zellen ausgesät, beim 2-Kammerträger 20.000. Die Zellen wurden über Nacht im Brutschrank inkubiert. Hela und B16 bei 37°C, St14A wahlweise bei 33°C oder bei 39°C.

Für die 8-Kammerträger wurde 1µl Lipofektamin zu 24µl OptiMEM gegeben, sowie 6µl der DNA mit einer Konzentration von 200ng/µl zu 19µl OptiMEM. Nach 5 Minuten wurden diese zwei Ansätze zusammengegeben und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Kurz vor Ablauf dieser Zeit wurde das Medium aus den Kammern gesaugt und durch 200µl OptiMEM ersetzt. Dazu kamen dann 50µl der DNA-Lipofektamin-Mischung. Die Objektträger wurden im Brutschrank für 6-8 Stunden inkubiert.

Anschließend wurde die Lösung abgesaugt und 250µl Nährmedium aufgegeben und im Brutschrank bis zum Erreichen der 24 Stunden weiterinkubiert. Für die 2-Kammerträger wurden alle verwendeten Mengen verdoppelt.

3.2.9 Fixation der Zellen

Material: 4% Paraformaldehyd in PBS
Moviol

Durchführung: Nach Absaugen des Mediums wurden die Objektträgerkammern in einer feuchten Kammer für 30 Minuten mit 4%Paraformaldehyd in PBS befüllt. Dies waren 200µl pro Kammer für den 8-Kammerträger und 500µl pro Kammer für den 2-Kammerträger. Nachdem immunhistochemische Färbungen durchgeführt wurden, wurde der Kammeraufbau restlos entfernt und einige Tropfen Moviol aufgebracht. Anschließend wurde das Deckglas möglichst blasenfrei aufgelegt.

3.3 Immunhistochemische Färbungen

Mit Hilfe von Antikörpern, die spezifisch gegen bestimmte Strukturen gerichtet sind, können diese markiert werden. Dazu wird nach dem Einsatz der Primärantikörper, die an die Struktur binden, ein zweiter Antikörper, der Sekundärantikörper, zugegeben. Dieser bindet spezifisch an den Primärantikörpern und kann mit Licht bestimmter Wellenlänge zur Fluoreszenz angeregt werden.

Material: Primärantikörper
Polyklonale Kaninchen-Antikörper gegen Humanes Spastin
1: Spezifität gegen Peptid 130-142 (DPC Biermann Cat.-Nr. BP962)
2: Spezifität gegen Peptid 204-215 (DPC Biermann Cat.-Nr. BP964)
Maus Anti- α -Tubulin
Sekundärantikörper
Ziege Anti-Kaninchen-Antikörper, Cy3 markiert

Ziege Anti-Maus-Antikörper, Cy2 markiert

TritonX 100

Durchführung: Der Inhalt des Objekträgeraufbaus wurde ersetzt durch 0,1% TritonX 100 in PBS und 5 Minuten inkubiert. Die 2-Kammerträger mit 500µl je Kammer und die 8-Kammerträger mit 200µl je Kammer. Dieser Schritt wurde noch zweimal wiederholt. Die Primärantikörper wurden mit PBS in einer 1:500 Verdünnung verwendet. Die Zellen wurden mit 500µl des Antikörper/PBS-Mix in einer feuchten Kammer für 1 Stunde inkubiert. Die Sekundärantikörper wurden mit PBS in einer 1:200 Verdünnung verwendet. Sie wurden nach Absaugen der Objektträgerkammern in Menge und Vorgehen analog zu den Primärantikörpern inkubiert. Zum Schluss wurde noch einmal drei Waschschrte mit 0,1% TritonX 100/PBS wie oben beschrieben durchgeführt.

3.4 Mikroskopische Auswertung mit einem Konfokalem Fluoreszenzmikroskop

Bei einem konventionellen Fluoreszenzmikroskop wird das Anregungslicht, das das GFP oder die Sekundärantikörper zum Emittieren von Licht anregt, über einen dichroischen Spiegel durch ein Objektiv auf das Objekt reflektiert. Das längerwellige Emissionslicht passiert den Spiegel und kann so durch das Okular betrachtet werden (s. Abbildung 5). Beim konfokalen Fluoreszenzmikroskop muss das Licht, bevor es auf den dichroischen Spiegel trifft, noch eine Lochblende passieren. Auch das emittierte Licht muss nach Passage des Spiegels, auf dem Weg zum Detektor durch eine Lochblende. Mit Hilfe der Lochblenden und der Linse kann das Licht aus der Brennebene fokussiert werden und störendes Licht aus anderen Objektebenen ausgeblendet werden. Es wird so allerdings immer nur ein Punkt abgebildet, um ein Bild zu erhalten, muss die Brennebene des Objekts Punkt für Punkt „gescannt“ werden.

Durchführung: Es wurde ein Zeiss LSM 510 Laserfluoreszenzmikroskop zur Auswertung genutzt. Es wurde die von Hersteller empfohlene Einstellung zur Auswertung von GFP bzw. von Cy2 und Cy3 verwendet.

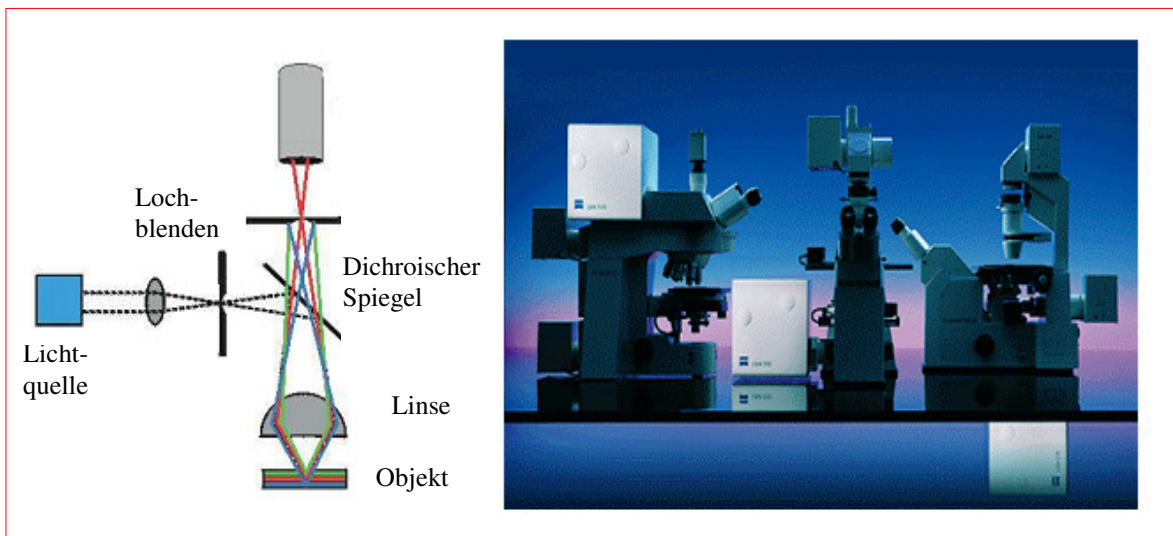


Abbildung 3: Die Abbildung zeigt links den schematischen Aufbau eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops. Rechts ist ein Bild mit dem verwendeten Lasermikroskop zu sehen. (Quelle: Carl Zeiss)

4 Ergebnisse

4.1 Kontrollen

Zum Vergleich mit den gewonnenen Ergebnissen wurden alle Zelllinien mit dem „leeren“ GFP-Vektor, d.h. ohne Einfügung von DNA, transfiziert. Hierbei verteilte sich das GFP gleichmäßig sowohl im Zytoplasma und Kern. Unbehandelte Zellen wurden einer Antikörperfärbung des Tubulin unterzogen. Die Transfektionsrate lag für Hela und B16 bei ca. 20%, für St14A bei Einzelfällen (d.h. unter 5%).

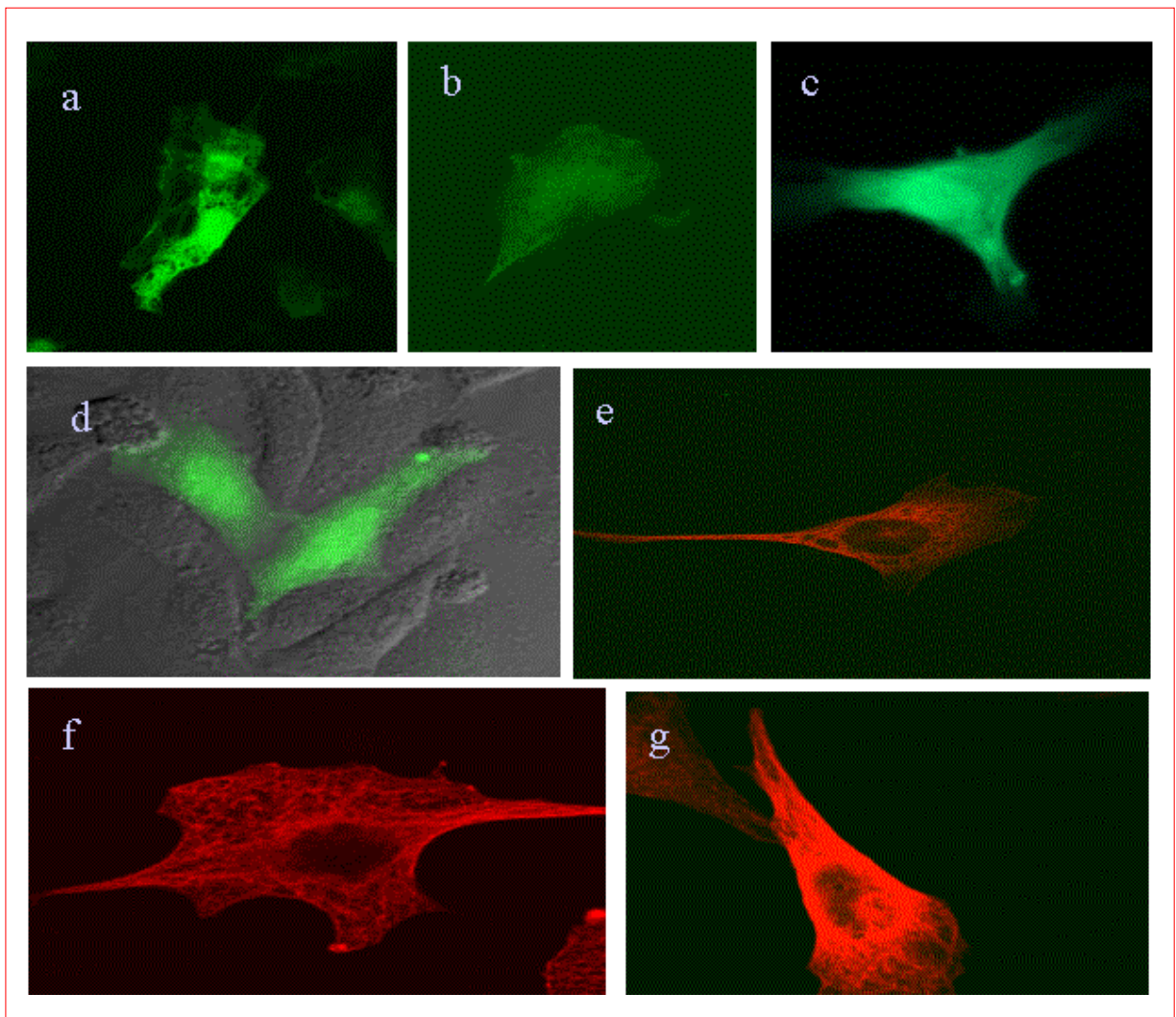


Abbildung 4: Die Abbildung zeigt Bilder der durchgeführten Kontrollen. : a) GFP-Kontrolle von St14A-Zellen bei 33°C; b) GFP-Kontrolle bei 39°C neuronal ausdifferenzierten St14A; c) GFP-Kontrolle einer B16-Zelle; d) GFP-Kontrolle einer Hela-Zelle. Auch wurden Kontrollen mit der Antikörperfärbung des Tubulin durchgeführt: e) Tubulin-Kontrolle bei einer bei 39°C ausdifferenzierten St14A-Zelle; f) Tubulin-Kontrolle einer Hela-Zelle; g) Tubulinfärbung bei einer B16-Zelle.

4.2 Transient überexprimierte GFP-Konstrukte

4.2.1 GFP-Konstrukte mit Wildtyp-Spastin

Das ubiquitär exprimierte Wildtyp-Spastin wurde als GFP-Fusionsprotein transient überexprimiert. Die Zellen wurden nach einer Expressionszeit von 24 Stunden fixiert. Vorher wurde eine Tubulinfärbung mittels Antikörper durchgeführt, um diese Zellstruktur sichtbar zu machen. Bei der mikroskopischen Auswertung der Fluoreszenz zeigten sich eng um den Kern einzelne, sehr kräftige „spots“, innerhalb des Kerns war keine Aktivität nachweisbar. Das Tubulin in transfizierten Zellen gegenüber nicht-transfizierten Zellen war deutlich reduziert. Die beobachtete Lokalisation, bzw. die beschriebenen Effekte auf das Zytoskelett des Spastin-Wildtyp-GFP Fusionsproteins konnten sowohl bei den N-terminal wie auch bei den C-terminal fusionierten GFP und in allen eingesetzten Zelllinien beobachtet werden. Das schloss auch die bei 39°C neuronal ausdifferenziert St14A-Zellen ein. Die Transfektionsrate lag für Hela und B16 bei ca. 12%, für St14A bei unter 5%.

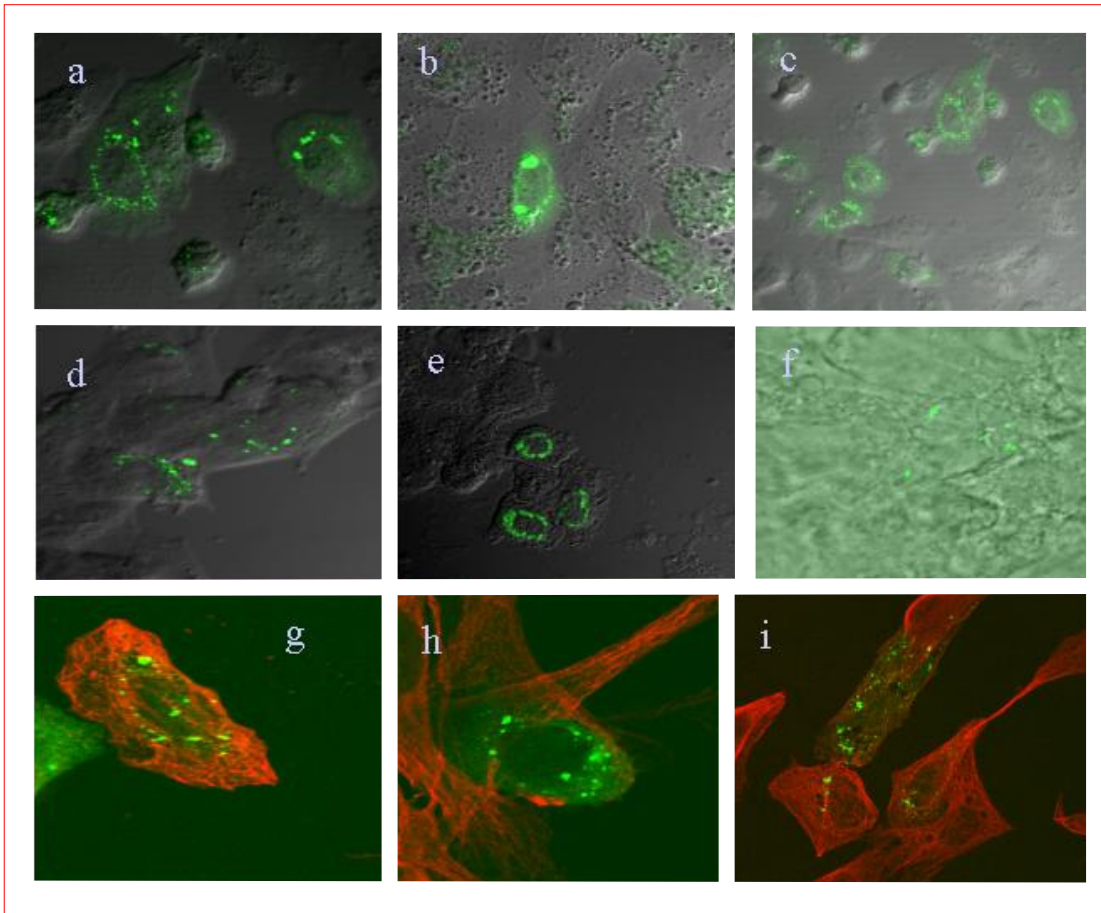


Abbildung 5: Die Abbildungen zeigen das überexprimierte Spastin-GFP-Konstrukt. Deutlich ist die ausschließliche perinukleäre Lokalisation zu sehen. a)-c) Spastin-GFP mit N-terminal fusionierten GFP in HeLa-Zellen, d) Spastin-GFP mit N-terminal fusionierten GFP in einer B16-Zelle. e) Spastin mit C-terminal fusioniert GFP in einer B16-Zelle, f) N-terminal fusioniertes GFP-Konstrukt in St14A-Zelle bei 33°C. g)-h). Im Vergleich mit Kontrollen zeigt sich eine Schwächung des angefärbten Tubulin in den transfizierten Zellen. g) HeLa-Zelle und h) B16 Zelle. In i) ist die Reduktion des Tubulin in einer St14A-Zelle (33°C) anhand der umgebenden nicht transfizierten Zellen besonders deutlich.

4.2.2 GFP-Konstrukte mit S44L

In diesem Konstrukt lag ein seltener Genpolymorphismus des Spastin vor. Dabei handelt es sich um eine Punktmutation, die außerhalb der AAA-Domäne liegt und die zu einem Missense führt, d.h. sie führt zu einem Aminosäureaustausch an der Position 44 von Serin zu Leucin. Dieses Konstrukt führte wie alle eingesetzten Fusionsproteinkonstrukte zur übermäßigen Expression des Proteins. Es wurde transient transfiziert und anschließend für 24 Stunden exprimiert. In der Auswertung zeigte die Lokalisation im Vergleich zum Wildtyp-Konstrukt keine signifikante Abweichung, war also eine Verteilung in kräftigen punktförmigen Zusammenlagerungen um den Kern. Und auch hier war keine nukleäre Fluoreszenz nachweisbar. Die Anfärbung von Tubulin in den Zellen zeigte eine Verminderung dieser Struktur im Vergleich zu nicht-transfizierten Zellen. Die Transfektionsrate lag für HeLa und B16 bei ca. 20%, für St14A bei 5%.

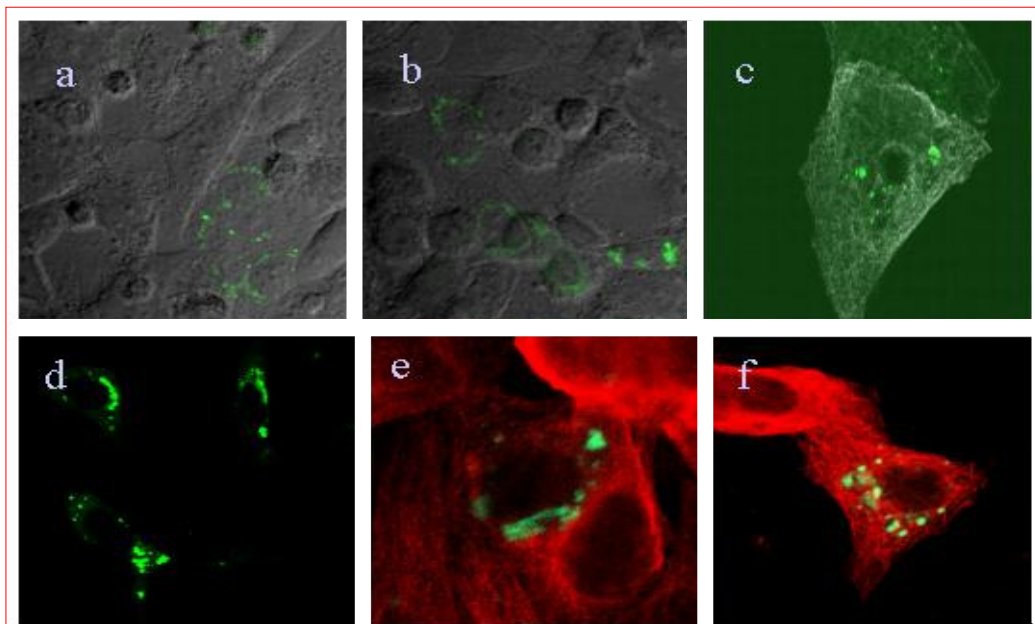


Abbildung 6: Die Abbildung zeigt Zellen mit S44L-GFP-Konstrukten. In a) HeLa-Zelle mit C-terminal fusioniertem GFP-Spастin, b) N-terminal mit GFP fusioniertes Spастin in HeLa. c) N-terminal fusioniertes Spастin in St14A -Zelle (33°C), d) dasselbe Konstrukt in B16-Zellen. In allen genannten Abbildungen ist eine Verteilung um den Kern deutlich. Bei einer gleichzeitigen Anfärbung des α -Tubulin (hier rot) zeigte sich eine Verminderung. e) und f) N-terminales S44L-GFP-Konstrukt in B16-Zellen.

4.2.3 GFP-Konstrukte mit K388R

In diesem Konstrukt trug das Spastin eine Mutation, wie sie in symptomatischen Erkrankungen vorkommt. Es handelte sich um eine Punktmutation innerhalb der AAA-Kassette, die zu einem Austausch an Position 388 von Lysin zu Arginin führt. Es war keine Aktivität des Fusionsproteins im Kern nachweisbar. Es zeigte sich eine wolkeig durch das ganze Zytosol ziehende Verteilung mit starker Betonung des perinukleären Bereiches. Diese Verteilung, starke Aktivität in einem dichten Bereich um den Kern, die zur Zellperipherie abnimmt, wäre durchaus typisch für das Zellskelett. Eine Verminderung von Tubulin war in den transfizierten Zellen nicht festzustellen. Die Transfektionsrate lag für Hela und B16 bei ca. 18%, für St14A wieder nur bei Einzelfällen.

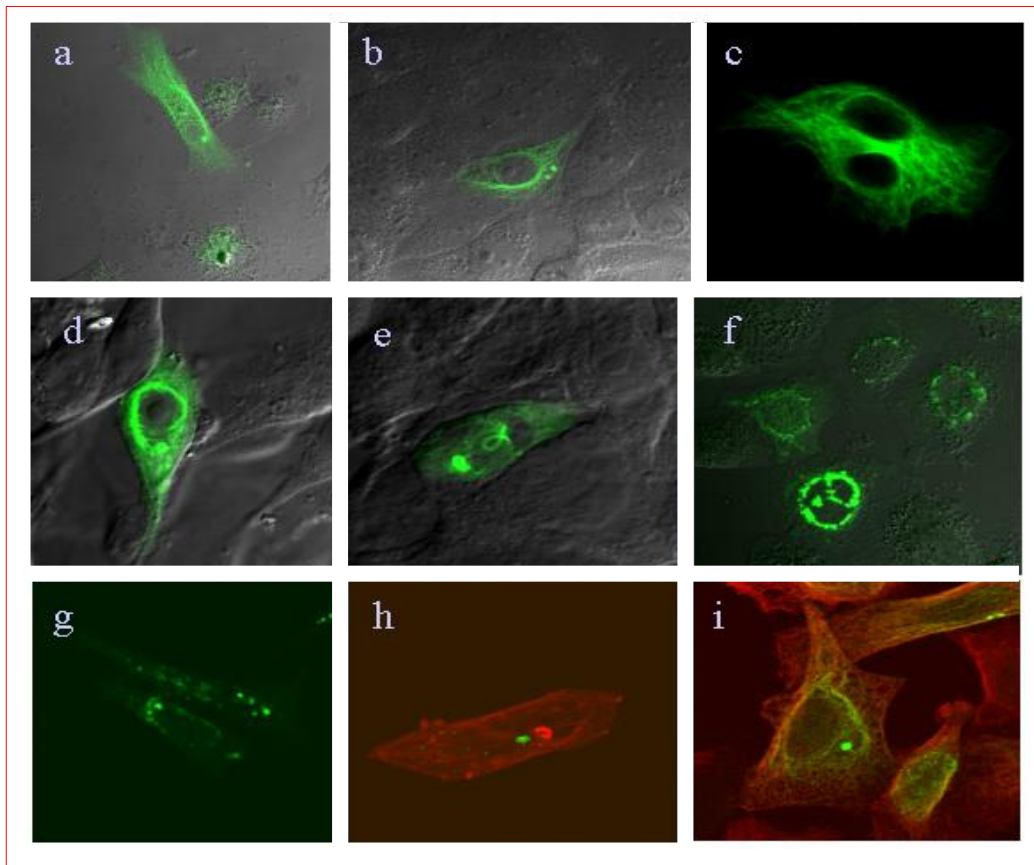


Abbildung 7: Die Abbildungen zeigen Zellen die mit K388R-GFP-Konstrukten transfiziert wurden. Die Verteilung des Konstrukts zieht sich wolkeig durchs Zytoplasma, mit Betonung des perinukleären Bereichs. a) und b) Hela-Zellen mit N-terminal fusioniertem GFP. c) C-terminal fusionierten Protein in Hela. d), e) und f) zeigen B16-Zellen, die ersten beiden mit N-terminal fusionierten K388R, die letztere mit C-terminal fusioniertem K388R. g) St14A-Zellen bei 39°C mit N-terminalem GFP-K388R Konstrukt. Die Markierung des α -Tubulin zeigte keine Abschwächung in transfizierten Zellen. h) St14A-Zelle bei 33°C mit K388R mit N-terminalen GFP, i) Hela-Zellen mit K388R mit N-terminalen GFP.

4.2.4 GFP-Konstrukte und Spastin-Antikörper

Hela-Zellen wurden mit GFP-Fusionsproteinen transfiziert. Wir verwendeten das Wildtyp-Spastin und die K388R-Mutation, um der wichtigen AAA-Domäne Rechnung zu tragen, und überexprimierten diese für 24h. Anschließend wurden die Zellen mit einem der zwei eingesetzten Antikörper inkubiert. Eine verstärkte Konzentration um den Kern erwies sich als gemeinsame Lokalisation. Während aber die Fusionsproteine auch hier extranukleär blieben, zeigten die Antikörpern zusätzlich eine gleichmäßige nukleäre Verteilung.

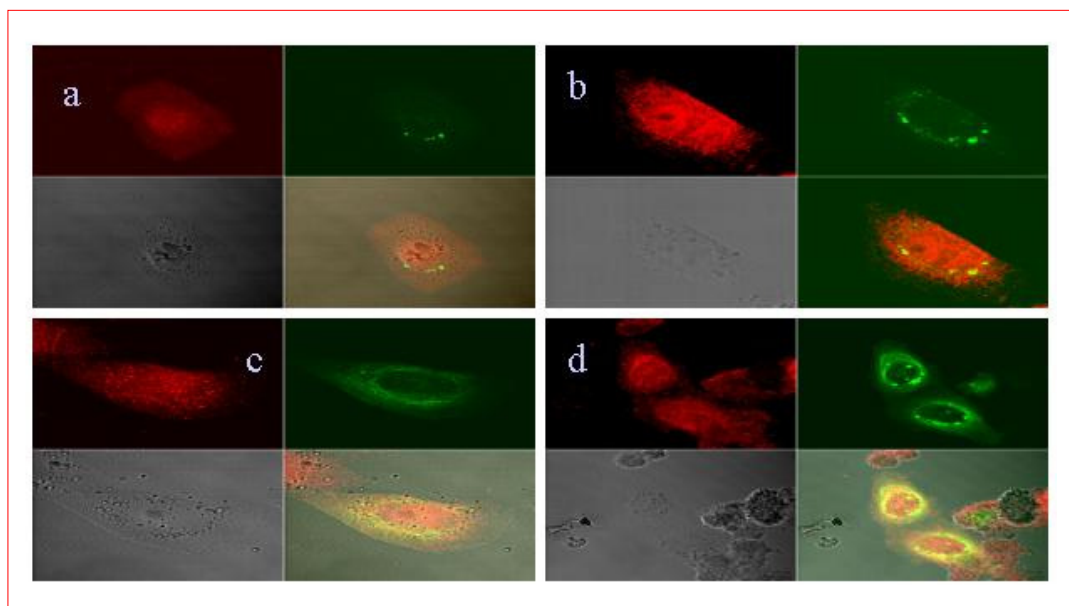


Abbildung 9: Die Abbildungen zeigen Hela-Zellen die mit den N-terminalen GFP-Fusionsproteinen des Wildtyps und K388R transfiziert wurden, 24h das jeweilige Fusionsprotein exprimierten und anschließend mit einem der Antikörper behandelt wurden. Es wird eine Vierfelderansicht gezeigt, bei der im ersten Feld immer das Antikörperbild, im zweiten Feld das GFP-Fusionsproteinbild, im dritten eine Durchlichtansicht und im vierten Feld eine Projektion der drei Vorgenannten zu sehen ist. a) Spastin-GFP-Fusionsprotein mit BP962, b) Spastin-GFP-Fusionsprotein mit BP964. In beiden ist neben der nukleären Lokalisation der Antikörper, noch die perinukleäre Co-Lokalisation zu sehen. Dies ist ebenso in den Abbildungen c) und d) erkennbar. c) K388R-GFP-Fusionsprotein mit BP962, d) K388R-GFP-Fusionsprotein mit BP964.

4.3 Native Zellen

4.3.1 Antikörper gegen Spastin

Peptidantikörper boten die Möglichkeit, bei einem physiologischen Spiegel des Spastin zu arbeiten. St14A-Zellen können temperaturabhängig neuronal differenzieren, was sie im Besonderen im Zusammenhang mit einer neurologischen Erkrankung interessant machte.

Es kamen zwei Peptidantikörper zur Anwendung, diese werden hier BP962 und BP964 genannt und für beide ist eine spezifische Bindung für Spastin beschrieben (DPC Biermann, s. 2.2.12). Hierbei konnte eine Fluoreszenz im Kern nachgewiesen werden, die sich in diesem gleichmäßig verteilte. Neben der nukleären war auch eine zytoplasmatische Lokalisation nachweisbar. Die zytoplasmatische Lokalisation war verstärkt in einem engen Bereich um den Kern zu beobachten.

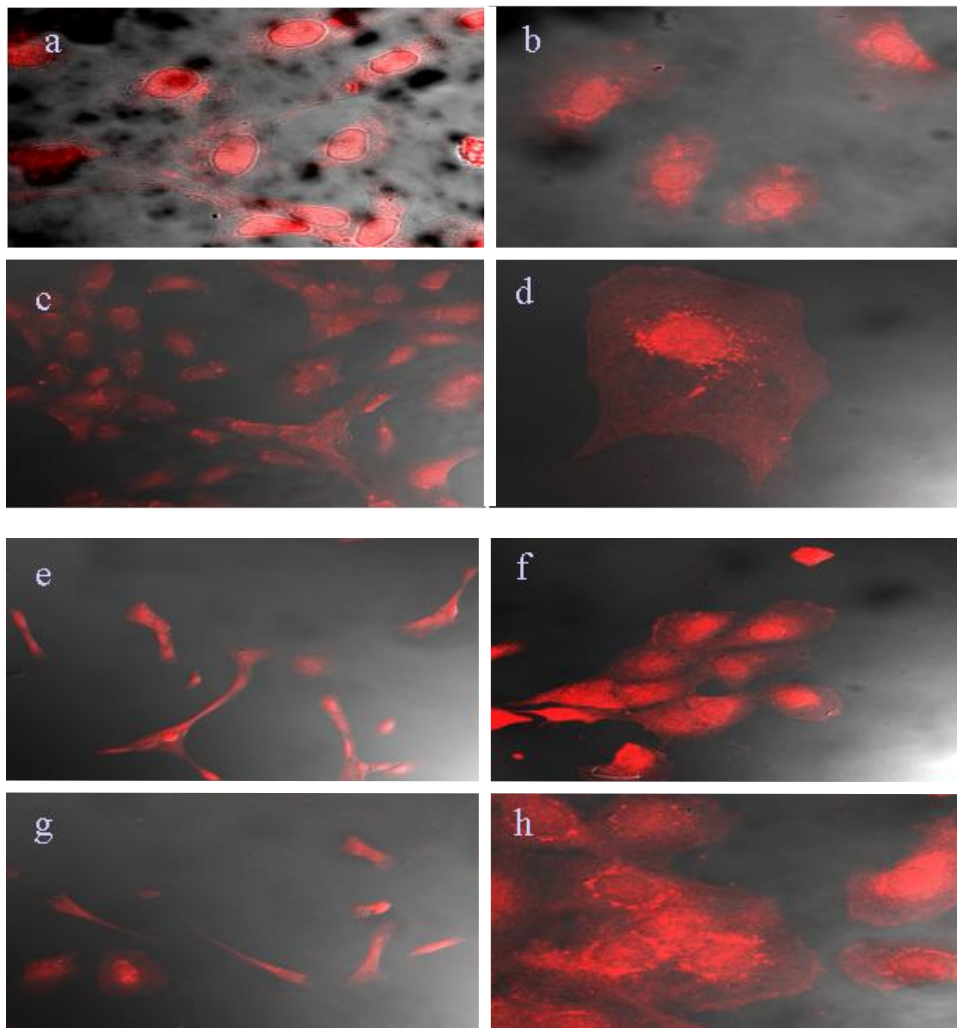


Abbildung 10: Die Abbildungen zeigen St14A-Zellen, die mit einem von den zwei eingesetzten Antikörpern, BP962 und BP964, inkubiert wurden. Beide Antikörper wurden sowohl bei proliferierenden Zellen bei 33°C eingesetzt, wie auch bei neuronal ausdifferenzierten Zellen bei 39°C. Die Abbildungen a)-d) St14A Zellen bei 33°C, a) und b) wurden mit dem Antikörper BP962 inkubiert, die Abbildungen c) und d) mit BP964. In allen ist die Kernlokalisierung mit einem perinukleären, zytoplasmatischen Saum zu sehen. e)-h) bei 39°C neuronal ausdifferenzierte St14A-Zellen, e) und f) zeigen mit BP962 behandelte Zellen, g) und h) mit BP964.

4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Im Bezug auf die Lokalisation konnten mit den GFP-Fusionsproteinen eine extranukleäre Verteilung beobachtet werden. Die spezifischen Verteilungsmuster variierten zum Teil erheblich. Während das Wildtyp-GFP sich genauso wie die S44L-GFP in „spots“ ringförmig um den Kern lagerte, zeigte sich das K388R-GFP-Protein in einer wolkigen Verteilung um den Nukleus. Das Tubulin zeigte in Zellen die mit dem Wildtyp-GFP transfiziert waren, eine deutliche Reduktion des Tubulins im Vergleich mit nicht-transfizierten Zellen. Dieser Effekt konnte auch bei S44L beobachtet werden. Bei der K388R-Mutante war keine Verringerung von Tubulin nachweisbar. Die genannten Beobachtungen waren in allen eingesetzten Zelllinien, bei St14A-Zellen in proliferativer und neuronaler Differenzierung, zu machen. Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen C- oder N-terminal fusionierten GFP. In der Tabelle 3.1 sind die Ergebnisse für die GFP-Konstrukte in einer Übersicht aufgeführt.

Mit Hilfe von Peptidantikörper konnte Spastin sowohl im Kern wie auch im Zytoplasma nachgewiesen werden. Zwar war eine perinukleäre Verdichtung zu sehen, aber die Verteilung zog sich weit in das Zytoplasma. Hela-Zellen, die Spastin-GFP-Konstrukte überexprimierten und die mit Spastin Antikörpern inkubiert wurden, zeigten eine gemeinsame perinukleäre Verdichtung der jeweiligen Verteilungen. Aber während das Fusionsprotein eine rein zytoplasmatische Lokalisation zeigte, waren die Antikörper auch im Kern nachweisbar.

Spastin-Konstrukt	Zelllinie	Lokalisation	Tubulin
Wildtyp-GFP	Hela	Ringförmig perinukleär	vermindert
	B16	Ringförmig perinukleär	vermindert
	St14A bei 33°C	Ringförmig perinukleär	vermindert
	St14A bei 39°C	Ringförmig perinukleär	vermindert
S44L-GFP	Hela	Ringförmig perinukleär	vermindert
	B16	Ringförmig perinukleär	vermindert
	St14A bei 33°C	Ringförmig perinukleär	vermindert
	St14A bei 39°C	Ringförmig perinukleär	vermindert
K388R-GFP	Hela	Wolkig perinukleär und zytosolisch	unvermindert
	B16	Wolkig perinukleär und zytosolisch	unvermindert
	St14A bei 33°C	Wolkig perinukleär und zytosolisch	unvermindert
	St14A bei 39°C	Wolkig perinukleär und zytosolisch	unvermindert

Tabelle 2: Zusammenfassung der Lokalisation der verschiedenen Spastin-GFP-Konstrukte, sowie die Wirkung auf das Tubulin in den transfizierten Zellen im Vergleich zu nicht-transfizierten.

5 Diskussion

5.1 Lokalisation des Spastins

Mit den GFP-Konstrukten von Spastin und dessen Mutationen konnten die bereits vorliegenden Daten anderer Arbeiten zu deren Lokalisation nachvollzogen werden (Errico et al. 2002, McDermott et al. 2003). So zeigte der Wildtyp bei der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung mit einem konfokalen Lasermikroskop eine kräftige, punktförmige Verteilung in einer engen Zone um den Kern. Es konnte aber keinerlei GFP-Aktivität innerhalb des Kerns beobachtet werden. Diese zytoplasmatische Verteilung ließ sich genauso beim GFP-Konstrukt von S44L beobachten. Dagegen wich das Konstrukt mit K388R von dieser Verteilung ab. Zwar war auch diese Mutante nur außerhalb des Kerns lokalisiert, sie zeigte jedoch keine punktförmige, sondern eine wolkige, verzweigte Verteilung, die sich relativ eng um den Kern spannte. Die AAA-Domäne ist in dieser Proteinklasse für die Umsetzung von ATP verantwortlich. Durch die Mutation in der Domäne bei K388R verliert das Protein diese Fähigkeit und kann sich so nicht mehr aus seiner Bindung an die Zielstruktur lösen (Errico et al. 2002). Die für die einzelnen Fusionsproteine beschriebenen Verteilungen änderten sich auch nicht in Abhängigkeit davon, ob das GFP ans N- oder C-terminale Ende des Gens bzw. seiner Mutationen fusioniert wurde. Die Verteilungsmuster, zytoplasmatisch und perinukleär, blieben unabhängig von der eingesetzten Zelllinie bzw. einer neuronalen Differenzierung bei St14A, gleich. Diese Muster lassen an eine mögliche Co-Lokalisation mit dem kernnahen Zytoskelett denken. Zellen, die K388R-GFP überexprimierten und deren α -Tubulin markiert war, zeigten eine weitgehende Überlagerung beider Fluoreszenzen. Zwischenzeitlich konnte eine Arbeitsgruppe auch eine konkrete Bindungsstelle für Mikrotubuli beim Spastin nachweisen. Diese Domäne wird MIT (microtubule interacting and trafficking molecules) genannt (Cicarelli et al. 2003).

Bei den GFP-Fusionsproteinen mit Spastin und den eingesetzten Mutationen war in den durchgeführten Versuchen nur im perinukleären Zytosol Aktivität nachzuweisen. Eine Arbeitsgruppe um Charvin beobachtete aber eine reine Kernlokalisation von Spastin. Hierbei wurden zwei verschiedene Peptidantikörper in einem zellulären „in vivo“ Modell eingesetzt (Charvin et al. 2003).

5.2 Kernlokalisation von Spastin

Mit überexprimierten GFP-Fusionsproteinen konnte keine Kernlokalisation gefunden werden. Wir brachten zwei Peptidantikörper zum Einsatz, die spezifisch an Spastin binden. Zunächst wurden Hela-Zellen, die auch mit Wildtyp-Spastin oder K388R in GFP-Konstrukten transfiziert waren, mit den Antikörpern inkubiert. Die GFP-Konstrukte zeigten wiederum ihre jeweilige perinukleäre Lokalisation. Die beiden Antikörper zeigten nicht nur in einem perinukleären Bereich Aktivität, sondern auch im gesamten Kern. Bei Versuchen mit nativen St14A-Zellen in neuronaler und nicht-neuronaler Differenzierung zeigte sich dasselbe Bild. Der Nachweis von zwei NLS (Nuclear Localisation Site) ergänzt die von uns gemachten Beobachtungen. Diese befinden sich in den Exons 1 und 6 von Spastin, beide können unabhängig voneinander einen Eintritt in den Kern vermitteln (Beetz et al. 2004).

In einer aktuellen Arbeit von Claudiani et al. werden zwei Translationstarts innerhalb des Spastingens nachgewiesen, woraus eine 68kDa und eine 60kDa langen Isoform von Spastin resultieren. Beide haben die beschriebenen NLS und werden in den Kern transportiert. Die 68kDa lange Isoform verfügt über ein NES (Nuklear Export Signal), das einen effizienten Transport aus dem Kern veranlasst. Diese Isoform, die reichlich in Hirn und Rückenmarkszellen vorhanden ist, findet sich im Zytoplasma. Die 60kDa Isoform findet sich sowohl im Kern wie im Zytoplasma. Bei Entfernung der nicht translatierten Region am 5'-Ende ist die Relation der zwei Isoformen sich zugunsten der 68kDa Isoform verschiebt. Diese Region war bei den überexprimierten Fusionsproteinvektoren nicht vorhanden, was zu einer starken Verschiebung zur zytoplasmatischen Isoform geführt hat (Claudiani et al. 2005).

5.3 Effekt des Spastins auf α -Tubulin

Der Nachweis einer Bindestelle für Mikrotubuli, der MIT, bestätigte Vermutungen, Spastin könnte im Mikrotubuli-Stoffwechsel involviert sein. MIT steht für „microtubule interacting and trafficking molecules“ und ist am N-terminalen Ende des Proteins lokalisiert (Ciccarelli et al. 2003). Das dem Spastin sehr ähnliche Katanin, das ebenfalls zur Gruppe der AAA-Proteine gehört zeigt einen abbauenden Effekt auf Mikrotubuli (Hartmann et al. 1999). Ein konkreterer Zusammenhang mit Mikrotubuli konnte 2002 von Errico et al. nachgewiesen werden. Die Arbeitsgruppe wies eine Verminderung von Mikrotubuli in Zellen nach, die Spastin im Übermaß exprimierten (Errico et al. 2002).

Wir konnten in Zellen, die GFP-Konstrukte des Spastin-Wildtyps überexprimierten und in denen das α -Tubulin markiert war, ebenfalls eine starke Verringerung von α -Tubulin im Vergleich zu den Kontrollen beobachten. Bei S44L zeigte sich ebenfalls eine Verminderung des α -Tubulins, verglichen mit den Kontrollen. Bei K388R war keine signifikante Reduktion im Vergleich zu den Kontrollen erkennbar.

S44L ist ein Genpolymorphismus der SPG4. Es liegt eine Basenveränderung außerhalb der AAA-Domäne zugrunde. Sie löst bei homozygoten Trägern eine milde Form der Erkrankung aus. Bei zusätzlichem Vorliegen einer in der AAA-Domäne liegenden SPG4-Mutation konnte man ein früheres Erkrankungsalter, sowie einen schwereren Verlauf der Erkrankung zeigen, verglichen mit der alleinigen Mutation in der AAA-Domäne. Möglicherweise wird durch Phosphorylierung die Proteinbindung gehemmt (Svenson et al. 2004).

In *Drosophila* konnte ein Spastin-Homologon nachgewiesen werden, das ebenso wie das humane eine ATPase-Aktivität und eine MIT aufweist (Kammermeier et al. 2003). *Drosophila* und ihr Dspastin bietet sich so als komplexes „in vivo“ Modell an. Bei Versuchen wurde in den Dspastin-Haushalt auf RNA-Ebene und mit Überexpression eingegriffen. Bei einem verminderten Spiegel von Spastin konnte an der neuromuskulären Synapse eine übermäßige Zunahme von stabilisierten Tubulin festgestellt werden. Dies hatte Auswirkungen auf die Morphologie und das Wachstum der Synapse. Die synaptische Fläche des betroffenen Nerven nahm zu, die Neurotransmission ab. Eine Erhöhung des Spiegels bewirkte das mit einer Abnahme des abnorm stabilisierten Tubulin die synaptische Fläche abnahm und die Neurotransmission zu (Trotta et al. 2004). Dieser Zusammenhang zwischen Dspastin, der Fläche der Nervenendigung und der Stärke der Neurotransmission lässt sich mit der Abhängigkeit des Transports von Proteinen und Zellorganellen von Mikrotubuli erklären (Kammermeier et al. 2003). Da sich diese Form von stabilisiertem Spastin normalerweise nicht in synaptischen Nervenendigungen findet, sondern in den Axonen, könnte sie bei Anreicherung durch eine defekte Spastinfunktion das Wachstum des Nerven behindern. Reaktiv könnte sich die Neurotransmission erhöhen um die kleinere Fläche zu kompensieren. Bei unmäßig vielem Spastin erleichtert der Abbau der Mikrotubuli hingegen das Wachstum der Nervenendigung. Somit scheint Spastin im Sinne einer negativen Kontrolle der Mikrotubuli zu wirken (Trotta et al. 2004).

Sicher scheint, dass Spastin Mikrotubuli abbaut. Dies geschieht ATP-abhängig über die Bindungsdomäne, der so genannten MIT. In Zellen mit GFP-Spastinmutanten konnte eine ungewöhnliche Clusterung von Peroxisomen und Mitochondrien gezeigt werden

(McDermott et al. 2003). Der Nachweis einer Interaktion zwischen der der MIT und einem Protein des ESCRT (endosomal sorting complex required for transport)-III-Komplexes, für den eine Aufgabe beim intrazellulären Transport angenommen wird, deutet ebenfalls einen Zusammenhang an (Reid et al. 2005).

Die Identifikation von Reticulon1 als Bindungspartner ist ein weiterer Hinweis. Für Reticulon1 ist eine Funktion im vesikulären Transport bekannt (Mannan et al. 2006). Der Organellen- und Proteintransport der Zelle sind auf das Zytoskelett angewiesen. Deshalb sind gerade Nervenzellen mit ihren langen Zellfortsätzen empfindlich für Störungen des Transportes.

Als weitere Pathomechanismus der HSP werden eine Haploinsuffizienz wie auch ein negativ dominanter Effekt diskutiert. Für die Nonsense, splice-site und frame-shift Mutationen von Spastin wird eine Haploinsuffizienz als Pathomechanismus angenommen. Die Menge an intaktem Spastin reicht hierbei nicht aus, um die Funktion aufrecht zu erhalten (Fontknechten et al 2000, Charvin et al 2003).

Für Missense Mutationen konnte dies so nicht beschrieben werden (Charvin et al. 2003). Missense Mutationen, die sich in der AAA-Domäne befinden, wie z.B. K388R, binden in Überexpression irreversibel an die Microtubuli ohne diese abzubauen. Damit werden die Bindungsstrukturen für intaktes Spastin blockiert. (Errico et al. 2002, McDermott et al. 2003). Es gibt einige Hinweise, dass Spastin wie andere AAA-Proteine auch funktionelle Oligomere ausbildet (Errico et al. 2002, Baas et al. 2005).

6 Schlussfolgerung

Obwohl sich auch in dieser Studie GFP-Fusionsproteine mit Spastin nur außerhalb des Zellkerns fanden, deuten unsere Ergebnisse auf eine sowohl perinukleäre wie nukleäre Lokalisation hin. Die Antikörper zeigten Aktivität im und außerhalb des Kerns.

Spastin hat zwei Translationsstarts, mit zwei daraus resultierenden Isoformen unterschiedlicher Länge. Beide Isoformen besitzen zwei NLS, die auch unabhängig voneinander funktionieren. Die längere, 68kDa messende Isoform verfügt über zwei NES, die diese effektiv aus den Kern ins Zytoplasma bringt. Die kürzere, 60kDa messende Isoform ist sowohl im Kern, wie auch im Zytoplasma zu finden. Das Mengenverhältnis dieser Isoformen wird durch eine nicht translatierte Region am 5'-Ende des Gens reguliert. Fehlt dieses, wie z.B. bei den Fusionsproteinvektoren, findet sich vermehrt die zytoplasmatische Isoform.

Im Hirn- und im Rückenmarksgewebe findet sich vor allem die 68kDa Spastin-Isoform. Für die Funktion im Zytoplasma verdichten sich die Hinweise in Richtung der Mikrotubuli. Wie schon das strukturverwandte Katanin scheint Spastin einen abbauenden Effekt auf diesen Bestandteil des Zellskeletts auszuüben. In Zellen die Spastin im Übermaß exprimierten, war eine dramatische Reduktion des markierten α -Tubulin nachzuweisen. Auch konnte die MIT als Bindungsstelle für Mikrotubuli bestimmt werden. Wahrscheinlich bildet Spastin wie andere AAA-Proteine funktionelle Oligomere aus.

Der weit überwiegende Teil der nachgewiesenen Mutationen im Spastinogen befindet sich in der AAA-Kassette. Der Verlust der Funktion dieser Domäne führt zu einer irreversiblen Bindung an die Zielstruktur. Dies könnte die Mikrotubuli für funktionierendes Spastin blockieren. Auch eine Haploinsuffizienz kommt in Betracht. Hierbei sinkt das intakte Spastin unter einen zur Aufrechterhaltung der Funktion benötigten Spiegel. Beides wäre eine Erklärung für den autosomal-dominanten Vererbungsmodus. Spastin könnte durch den Abbau von Mikrotubuli einen negativen, regulierenden Effekt auf diese haben. Es gibt Hinweise darauf, dass es bei Zellen, die Spastinmutanten exprimierten zu Problemen mit dem intrazellulären bzw. axonalen Transport und nachfolgend dem Wachstum bzw. der Morphologie der Nervenzellen gibt. Das betreffe Nervenzellen mit ihren langen Axonen natürlich besonders.

In diesem Zusammenhang von besonderem Interesse sind auch die Beobachtungen an S44L. Liegt zusätzlich eine Mutation in der AAA-Kassette vor, zeigt sich ein schwererer Phänotyp mit früherem Erkrankungsalter als beim alleinigen Vorliegen der AAA-Mutation.

7 Literatur

Baas P.W., Karabay A., Qiang L., Microtubule cut and run. Trends cell biol. 2005, Oct, 15(10), 518-24

Baraitser M. Spastic paraplegia/HSP. In: Motulsky AG, Bobrow M, Harper PS, Scriver C, eds. The genetics of neurological disorders. 2nd ed. New York: Oxford University Press, 1990, 275-290.

Bayer A., Sequence analysis of the AAA protein family. Protein Sci. 1997, 6, 2043-2058

Beetz C., Brodhun M., Moutzouris K., Kientopf M., Berndt A., Lehnert D., Deufel T., Bastmeyer M., Schickel J., Identification of Nuclear Localisation Sequences in Spastin (SPG4) using a novel Tetra-GFP Reporter System, Biochem Biophys Res Commun 2004, Jun 11, 318(4), 1079-84

Blumen SC, Bevan S, Abu-Mouch S, Negus D, Kahana M, Inzelberg R, Mazarib A, Mahamid A, Carasso RL, Slor H, Withers D, Nisipeanu P, Navon R, Reid E, A locus for complicated hereditary spastic paraplegia maps to chromosome 1q24-q32. Ann Neurol. 2003 Dec, 54(6), 796-803

Bousslam N, Benomar A, Azzedine H, Bouhouche A, Namekawa M, Klebe S, Charon C, Durr A, Ruberg M, Brice A, Yahyaoui M, Stevanin G, Mapping of a new form of pure autosomal recessive spastic paraplegia (SPG28). Ann Neurol. 2005 Apr, 57(4), 567-71

Bönsch D, Schwindt A. et al, Motor system abnormalities in hereditary spastic paraparesis type 4 (SPG4) depend on the type of mutation in the spastin gene, Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry 2003; 74; 1109-1112

Casari G, De Fusco M, Ciarmatori S et al., Spastic paraplegia and OXPHOS impairment caused by mutations in paraplegin, a nuclear-encoded mitochondrial metalloprotease. Cell 1998; 93: 973-983.

Charvin D., Cifuentes-Diaz, Fonknechten N. et al, Mutation of SPG4 are responsible for a loss of function of spastin, an abundant neuronal protein localized in the nucleus, human Molecular Genetics, 2003, Vol 12, No. 1, 71-78

Ciccarelli F.D., Proukakis C., Patel H., Cross H., Azam S., Patton M.A., Bork P., Crosby A.H., The identification of a conserved domain in both spartin and spastin, mutated in hereditary spastic paraplegia, Genomics 2003, 81, 437-441

Pamela Claudiani, Elena Riano, Alessia Errico, Gennaro Andolfi, Elena I. Rugarli, Spastin subcellular localization is regulated through usage of different translation start sites and active export from the nucleus,

Errico, A., Ballabio, A. and Rugarli, E.I. Spastin, the protein mutated in autosomal dominant hereditary spastic paraplegia, is involved in microtubule dynamics. Hum. Mol. Genet. 2002, 11, 153–163.

Fink JK, Wu CB, Jones SM et al.: Autosomal dominant familial spastic paraplegia: tight linkage to chromosome 15q. Am J Hum Genet 1995; 56:188-192.

Fink J.K., Advances in hereditary spastic paraplegia, Curr Opin Neurol 10 (1996) 313-318

Fonknechten N., Mavel D., Byrne P., Davoine C.S., Cruaud C., Boentsch D., Samson D., Coutinho P., Hutchinson M., McMonagle P., Burgunder J.M., Tartaglione A., Heinzlef O., Feki I., Deufel T., Parfrey N., Brice A., Fontaine B., Prud'homme J.F., Weissenbach J., Durr A., Hazan J., Spectrum of SPG4 mutations in autosomal dominant spastic paraplegia., *Hum Mol Genet* 2000, 9, 637–44

Fontaine B, Davoine CS, Dürr A, Paternotte C, Feki I, Weissenbach J, Hazan J, Brice A. A new locus for autosomal dominant pure spastic paraplegia, on chromosome 2q24-q34. Am J Hum Genet 2000; 66: 702-707.

Hansen J.J., Durr A., Cournu-Rebeix I., Georgopoulos C., Ang D., Nielsen M.N., Davoine C.S., Brice A., Fontaine B., Gregersen N., Bross P., Hereditary spastic paraplegia SPG13 is associated with a mutation in the gene encoding the mitochondrial chaperonin Hsp60. *Am J Hum Genet* 2002, 70, 1328–32

Harding AE. Hereditary spastic paraplegias. *Semin Neurol* 13, 1993, 333-336.

Hartmann J.J., Vale R.D., Microtubel Disassembly by ATP-Dependent Oligomerization of the AAA Enzyme Katanin, *Science* 1999, Vol 286, 782-785

Hazan J, Lamy C, Melki J, Munnich A, de Recondo J, Weissenbach J. Autosomal dominant familial spastic paraplegia is genetically heterogeneous and one locus maps to chromosome 14q. *Nature Genet* 1993; 5: 163-167.

Hazan J, Fontaine B, Bruyn RPM, Lamy C, van Deutekom JCT, Rime CS, Dürr A, Melki J, Lyon-Caen O, Agid Y, Munnich A, Padberg GW, de Recondo J, Frants RR, Brice A, Weissenbach J. Linkage of a new locus for autosomal dominant familial spastic paraplegia to chromosome 2p. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 1569-1573.

Hazan, J., Fonknechten, N., Mavel, D., Paternotte, C., Samson, D., Artiguenave, F., Davoine, C.S., Cruaud, C., Durr, A., Wincker, P. et al. Spastin, a new AAA protein, is altered in the most frequent form of autosomal dominant spastic paraplegia. *Nat. Genet.* 1999, 23, 296–303.

Hedera, P, Rainier S, Alvarado D, Zhao X, Williamson J, Otterud B, Leppert M, Fink JK. Novel locus for autosomal dominant hereditary spastic paraplegia, on chromosome 8q. *Am J Hum Genet* 1999 ; 64: 563-569.

Hentati A, Pericak-Vance MA, Hung WY et al.: Linkage of “pure” autosomal recessive familial spastic paraplegia to chromosome 8 markers and evidence of genetic locus heterogeneity. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 1263-1267.

Hodgkinson CA, Bohlega S, Abu-Amro SN, Cupler E, Kambouris M, Meyer BF, Bharucha VA, A novel form of autosomal recessive pure hereditary spastic paraplegia maps to chromosome 13q14. *Neurology*. 2002 Dec 24, 59(12), 1905-9

Hughes C.A., Byrne P.C., Webb S., McMonagle P., Patterson V., Hutchinson M., Parfrey N.A., SPG15, a new locus for autosomal recessive complicated HSP on chromosome 14q. *Neurology* 2001, 56, 1230–3

Jouet M, Rosenthal A, Armstrong G et al.: X-linked spastic paraplegia (SPG1), MASA syndrome and X-linked hydrocephalus result from mutations in the L1 gene. *Nature Genet* 1994; 7: 402-407.

Kammermeier L., Spring J., Stierwald M., Burgunder J.M., Reichert H., Identification of the *Drosophila melanogaster* homolog of the human spastin gene., *Dev Genes Evol.* Aug 2003, 213(8), 412-5

Mannan A.U., Boehm j., Sauter S.M., Rauber A., Byrne P.C., Neesen J., Engel W., Spastin, The most commonly mutated protein in hereditary spastic paraplegia interacts with Reticulon1 an endoplasmatic reticulum protein. *Neurogenetics* 2006 May, 7 (2), 93-103

Mc Dermott C. J., Grierson a. J., et al, Hereditary Spastic Paraparesis: Disrupted Intracellular Transport Associated with Spastin Mutation, *Ann Neurol* 2003; 54; 748-759

Meijer IA, Cossette P, Roussel J, Benard M, Toupin S, Rouleau GA, A novel locus for pure recessive hereditary spastic paraplegia maps to 10q22.1-10q24.1. *Ann Neurol.* 2004 Oct, 56(4), 579-82

Orlacchio A, Kawarai T, Gaudiello F, St George-Hyslop PH, Floris R, Bernardi G, New locus for hereditary spastic paraplegia maps to chromosome 1p31.1-1p21.1. *Ann Neurol.* 2005 Sep, 58(3), 423-9

Patel S., Latterich M. The AAA team: related ATPases with diverse functions. *Cell Biol* 1998, 8, 65-71.

Patel H., Hart P.E., Warner T.T., Houlston R.S., Patton M.A., Jeffery S., Crosby A.H., The Silver syndrome variant of hereditary spastic paraplegia maps to chromosome 11q12-q14, with evidence for genetic heterogeneity within this subtype. *Am J Hum Genet* 2001, 69, 209–15

Patel H., Cross H., Proukakis C., Hershberger R., Bork P., Ciccarelli F.D., Patton M.A., McKusick V.A., Crosby A.H., SPG20 is mutated in Troyer syndrome, an hereditary spastic paraplegia. *Nat Genet* 2002, 31, 347–8

Polo JM, Calleja J, Combarros O, Hereditary ataxias and paraplegias in Cantabria, Spain. An epidemiological and clinical study. *Brain* 1991, 114, 855-866

Rainier S, Chai JH, Tokarz D, Nicholls RD, Fink JK, NIPA1 gene mutations cause autosomal dominant hereditary spastic paraplegia (SPG6). *Am j Hum Genet.* 2003 Oct, 73(4), 967-71. Epub 2003 Sep 23.

Reid E. Pure hereditary spastic paraplegia. *J Med Genet* 34 1997, 499-503.

Reid E., Dearlove AM, Rhodes M, Rubinsztein DC. A new locus for autosomal dominant 'pure' hereditary spastic paraplegia mapping to chromosome 12q13, and evidence for further genetic heterogeneity. *Am J Hum Genet* 1999, 65, 757-763.

Reid E, Dearlove AM, Osborn O, Rogers MT, Rubinsztein DC. A locus for autosomal dominant 'pure' hereditary spastic paraplegia maps to chromosome 19q13. *Am J Hum Genet* 2000, 66, 728-732.

Reid E., Kloos M., Ashley-Koch A., Hughes L., Bevan S., Svenson I.K., Lennon Graham F., Gaskell P.C., Dearlove A., Pericak-Vance M.A., Rubinsztein D.C., Marchuk D.A., A kinesin heavy chain (*KIF5A*) mutation in hereditary spastic paraplegia (*SPG10*). *Am J Hum Genet* 2002, 71, 1189–94

Reid E., Connel J., Edwards T.L., Duley S., Brown S.E., Sanderson C.M., The hereditary spastic paraplegia protein spastin interacts with the ESCRT-III complex-associated endosomal protein CHMP1B. *Hum Mol Genet.* 2005 Jan 1, 14(1), 19-38

Sanderson C.M., Connell J.W., Edwards T.L., Bright N.A., Duley S., Thompson A., Luzio J.P., Reid E., Spastin and atlastin, two proteins mutated in autosomal-dominant hereditary spastic paraplegia, are binding partners. *Hum Mol Genet.* 2006 Jan 15, 15 (2), 307-18

Saugier-Weber F, Munnich A, Bonneau D et al.: X-linked spastic paraplegia and Pelizaeus-Merzbacher disease are allelic disorders at the proteolipid protein locus. *Nature Genet* 1994; 6: 257-262,

Sauter S., Neesen J., Paulus W., Engel W. Hereditäre spastische Paraplegie *Deutsches Ärzteblatt* 1 Jg. 99 1 Heft 7, 15. Februar 2002

Seri M, Cusano R, Forabosco P, Cinti R, Caroli F, Picco P, Bini R, Morra VB, De Michele G, Lerone M, Silengo M, Pela I, Borrone C, Romeo G, Devoto M., Genetic mapping to 10q23.3-q24.2, in a large Italian pedigree, of a new syndrome showing bilateral cataracts, gastroesophageal reflux, and spastic paraparesis with amyotrophy. *Am J Hum Genet* 1999, 64, 586-593.

Settasatian C., Whitmore S.A., Crawford J. et al., Genomic structure and expression analysis of the spastic paraplegia gene, SPG7. *Hum Genet* 1999, 105, 139-144.

Simpson MA, Cross H, Proukakis C, Pryde A, Hershberger R, Chatonnet A, Patton MA, Crosby AH, Maspardin is mutated in mast syndrome, a complicated form of hereditary spastic paraplegia associated with dementia. *Am J Hum Genet.* 2003 Nov, 73(5), 1147-56. Epub 2003 Oct 16.

Skre H., Hereditary spastic paraplegia in Western Norway. *Clin Genet* 1974, 6, 165-183.

Strümpell A. Beiträge zur Pathologie des Rückenmarks. *Arch Psychiatr Nervenkr* 10, 1880, 676-717.

Svenson I., Kloos M., Gaskell P., Nance Ma., Garben J., Hisanaga S., Pericak-Vance M., Ashley-Koch A., Marchuk D., Intragenic modifiers of hereditary spastic paraplegia due to spastic gene mutations., *Neurogenetics* 2004 Sep., 5(3): 157-64.

Tamagaki A., Shima M., Tomita R. et al., Segregation of a pure form of spastic paraplegia and NOR insertion into Xq11.2. *Am J Med Genet* 2000, 94, 5-8.

Trotta N., Orso G., Rossetto M.G., Daga A., Broadie K., The hereditary spastic paraplegia gene, spastin, regulates microtubule stability to modulate synaptic structure and function, *Curr Biol.* 2004 jul 13, 14 (13), 1135-47

Valente E.M., Brancati F., Caputo V., Bertini E., Patrono C., Costanti D., Dallapiccola B., Novel locus for autosomal dominant pure hereditary spastic paraplegia (SPG19) maps to chromosome 9q33-q34. *Ann Neurol* 2002, 51, 681-5

Vazza G, Zortea M, Boaretto F, Micaglio GF, Sartori V, Mostacciuolo ML, A new locus for autosomal recessive spastic paraplegia associated with mental retardation and distal motor neuropathy, SPG14, maps to chromosome 3q27-q28. *Am J Hum Genet* 2000, 67, 504-509

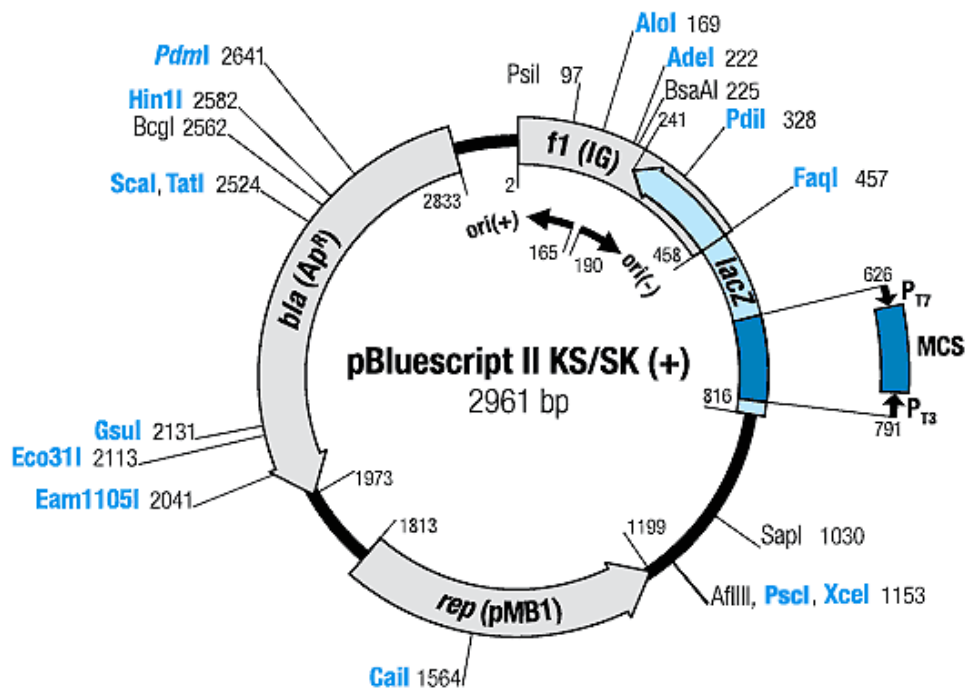
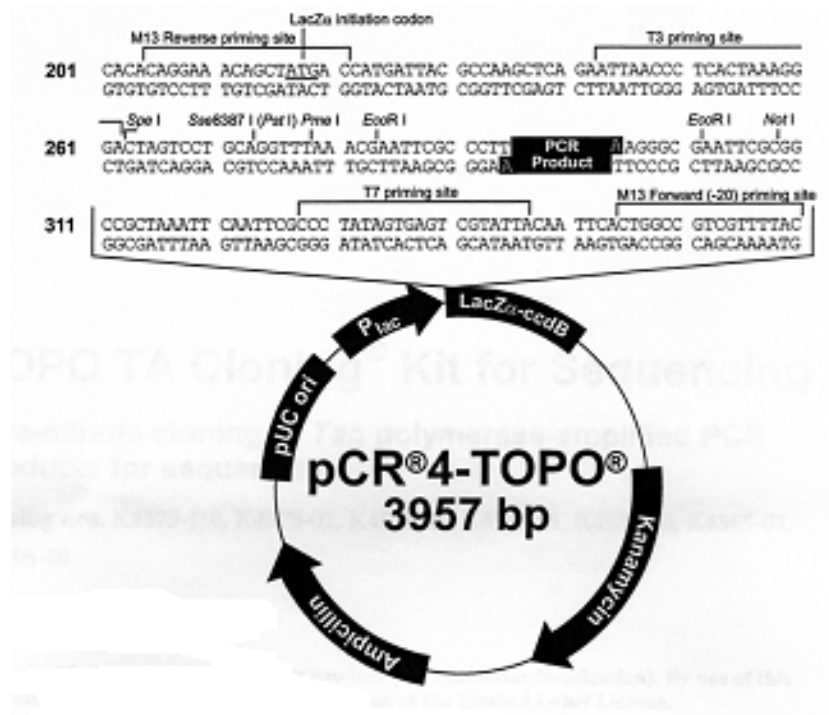
Werdelin L, Hereditary ataxias. Occurrence and clinical features. *Acta neurol Scand* 1986, 73 (Suppl. 106), 124

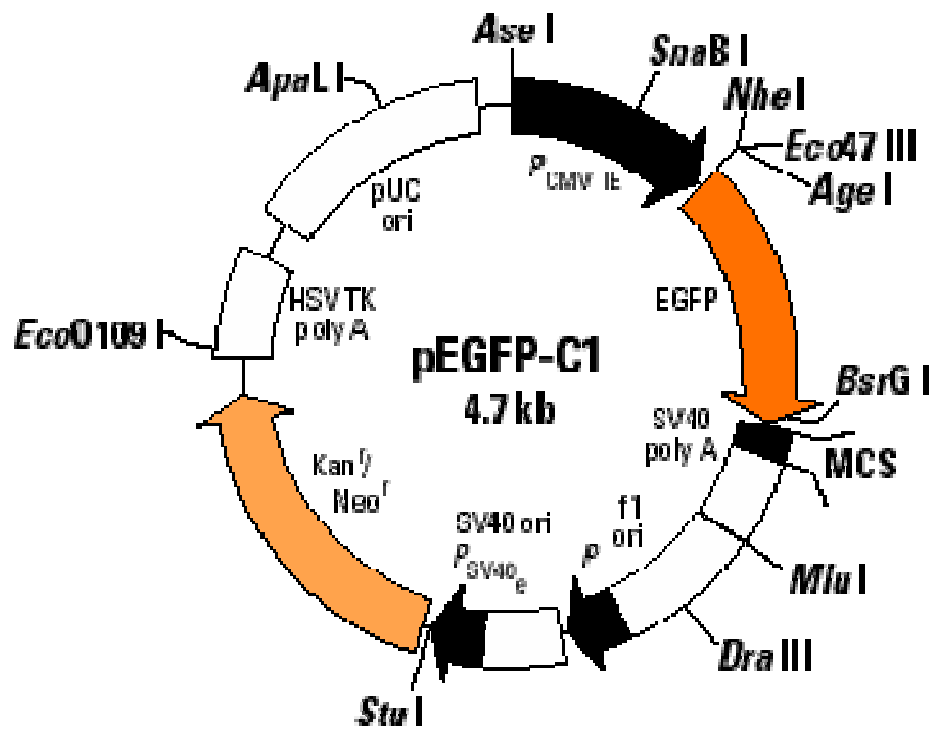
Wilkinson PA, Simpson MA, Bastaki L, Patel H, Reed JA, Kalidas K, Samilchuk E, Khan R, Warner TT, Crosby AH, A new locus for autosomal recessive complicated hereditary spastic paraplegia (SPG26) maps to chromosome 12p11.1-12q14. *J Med Genet.* 2005 Jan, 42(1), 80-2

Zortea M, Vettori A, Trevisan CP, Bellini S, Vazza G, Armani M, Simonati A, Mostacciuolo ML, Genetic mapping of a susceptibility locus for disc herniation and spastic paraplegia on 6q23.3-q24.1. *J Med Genet.* 2002 Jun, 39(6), 387-90

8 Anhang

8.1 Vektoren





CDNA von Spastin

```
TTCCCGTCGGTCTGCGGGAGGCGGGTTATGGCGGCGGCGGCAGTGAGAGCTGTGAATGAATTCTCCGGGTGGA
CGAGGGAAGAAGAAAGGCTCCGGCGGCGCCAGCAACCCGGTGCCTCCCAGGCCCTCCGCCCCCTTGCCTGGCCC
CCGCCCCCTCCCGCCGCGGGCCGGCCCCCTCCGCCCAGTCGCCGCATAAGCGGAACCTGTACTATTTCTCCTA
CCCCTGTTTGTAGGCTTCGCGCTGCTGCGTTTGGTCGCCTTCCACCTGGGGCTCCTCTTCGTGTGGCTCTGC
CAGCGCTTCTCCCGCGCCCTCATGGCAGCCAAGAGGAGCTCCGGGGCCGCGCCAGCACCTGCCTCGGCCTCGG
CCCCGGCGCCGGTGCCGGGCGGCGAGGCCGAGCGCGTCCGAGTCTTCCACAAACAGGCCTTCGAGTACATCTC
CATTGCCCTGCGCATCGATGAGGATGAGAAAGCAGGACAGAAAGGAGCAAGCTGTGGAATGGTATAAGAAAGGT
ATTGAAGAACTGGAAGAAAGGAATAGCTGTTATAGTTACAGGACAAGGTGAACAGTGTGAAAGAGCTAGACGCC
TTCAAGCTAAAATGATGACTAATTTGGTTATGGCCAAGGACCGCTTACAACTTCTAGAGAAGATGCAACCAGT
TTTGCCATTTTCCAAGTCACAAACGGACGTCTATAATGACAGTACTAACTTGGCATGCCGCAATGGACATCTC
CAGTCAGAAAGTGGAGCTGTTCCAAAAAGAAAAGACCCCTTAACACACACTAGTAATTCACGTGCCTCGTTCAA
AAACAGTTATGAAACTGGATCTGCAGGCCTTTCAGGCCACCATAGAGCACCTAGTTACAGTGGTTTTATCCAT
GGTTTCTGGAGTGAAACAGGGATCTGGTCCTGCTCCTACCCTCATAAGGGTACTCCGAAAACAAATAGGACA
AATAAACCTTCTACCCCTACAACCTGCTACTCGTAAGAAAAAAGACTTGAAGAATTTTAGGAATGTGGACAGCA
ACCTTGCTAACCTTATAATGAATGAAATTGTGGACAATGGAACAGCTGTTAAATTTGATGATATAGCTGGTCA
AGACTTGGCAAAACAAGCATTGCAAGAAATTGTTATTCTTCTCTGAGGCCGTGAGTTGTTTCACAGGGCTT
AGAGCTCCTGCCAGAGGGCTGTTACTCTTTGGTCCACCTGGGAATGGGAAGACAATGCTGGCTAAAGCAGTAG
CTGCAGAATCGAATGCAACCTTCTTTAATATAAGTGCTGCAAGTTTAACTTCAAAATACGTGGGAGAAGGAGA
GAAATTGGTGAGGGCTCTTTTTGCTGTGGCTCGAGAACTTCAACCTTCTATAATTTTTATAGATGAAGTTGAT
AGCCTTTTGTGTGAAAGAAGAGAAGGGGAGCACGATGCTAGTAGACGCCTAAAACTGAATTTCTAATAGAAT
TTGATGGTGACAGTCTGCTGGAGATGACAGAGTACTTGTAAATGGGTGCAACTAATAGGCCACAAGAGCTTGA
TGAGGCTGTTCTCAGGCGTTTCATCAAACGGGTATATGTGTCTTTACCAAATGAGGAGACAAGACTACTTTTG
CTTAAAAATCTGTTATGTAAACAAGGAAGTCCATTGACCCAAAAAGAACTAGCACAACCTTGCTAGAATGACTG
ATGGATACTCAGGAAGTGACCTAACAGCTTTGGCAAAAGATGCAGCACTGGGTCTTATCCGAGAACTAAAACC
AGAACAGGTGAAGAATATGTCTGCCAGTGAGATGAGAAATATTCGATTATCTGACTTCACTGAATCCTTGAAA
AAAATAAAACGCAGCGTCAGCCCTCAAACTTTAGAAAGCTACATACGTTGGAACAAGGACTTTGGAGATACCA
CTGTTTAAAGGAAATACCTTTGTAAACCTGCAGAACATTTTACTTAAAAAGAGGAAACACAAGATCTTCAATGAA
CGTCATCGGCTACAGAAACAGCCTAAGTTTACAGGACTTTTTAGAGTCTTACATATTTGTGCACCAAACCTTGA
AGATGAACCAGAAAACAGACTTAAACAAAATATACAATGCAAAATGTAATTTTTTGTGTTTAAAGGCCTTGCCT
TGATGGTCACAGTTATCCCAATGGACACTAAGTTAGAGCACAAACAAACCTGATTCTGGTCTTCTTTACCAAT
ATAATCATAATGTAAATAATAATTTGTATATTGTGTTGCAGATGAAAGTATTCCAGGAACAGTGAATGGTAGA
AGACACAAGAACATTTGTTTGTGTTGCTTCTGATGTTTTTCTTAAAAATAGTAATTTCTCCTACTTTTTCTTTT
CTACTGTTGTCTTAACTACAGGTGATTGGAATGCCAAACACTCTTAAGTTTATTTTCTTTTTTTCGTTTTATAA
ATTCAGTGTGCCAAATGAACTTTTTTCTTAAGTAACTGTAATAGGAAAAAGTTTATTTTGTAGAGTTTCTTCT
TCATAAATCTACAGACATTAAACAATTGTTGTGTTCTTTTTACCTTTTATTTTTCTATTACCTTGCTACCAAA
CAGTTTAGATAGCAATATAATAGCAAAAAAGCAAAATATGGTAAAAATAGAGAAGGTTTGAAGGTTTGAGTTACT
CTGTATATAACATGTAGATCAGTCTTCATGTGACCTGCAGTATTTTTTTTTCTAATGTATTTGTCAGAAATC
TGTTGTAGACTGTTAACTTCTTCTGATG
```

Abbildung 8: Die Abbildung zeigt die cDNA von Spastin. Das Start- bzw. das Stopcodon sind unterstrichen.

CURRICULUM VITAE

PERSÖNLICHE ANGABEN

Vorname: Konstantinos
Nachname: Moutzouris
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch
Geburtsdatum: 09.01.1976
Geburtsort: Wuppertal

BERUFSTÄTIGKEIT

Seit 07.2005 Tätigkeit als Assistenzarzt für Chirurgie am St. Elisabeth Krankenhaus Ravensburg.

STUDIUM

1997-2004 Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität in Jena (FSU-Jena).

Publikationen:

C. Beetz, M. Brodhun, K. Moutzouris, M. Kiehntopf, Berndt, D. Lehnert, T. Deufel, J. Schickel.

Identification of nuclear localisation sequences in spastin (SPG4) using a novel tetra-GFP reporter system.

Biochem Biophys Res Commun 2004 Jun 11;318(4):1079-84

SCHULBILDUNG

1982-83 Pestalozzi Volksschule, Augsburg
1983-86 Luitpold Grundschule, Augsburg
1986-89 Goethe Hauptschule, Augsburg
1989-93 Staatliche Realschule, Augsburg
1993-95 Holbein Gymnasium, Augsburg
1995-97 Maristenkolleg Mindlheim

Ravensburg, 07.03.08

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Prof. Dr. Thomas Deufel,

Dr. Jörg Schickel,

Cora Neumann,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ravensburg, 07.03.08